

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Renáta Konášová

Využití kapilární elektroforézy s UV fotometrickou a hmotnostně spektrometrickou  
detekcí s ionizací elektrosprejem ke studiu interakcí látek

Use of capillary electrophoresis with UV photometric and electrospray ionization  
mass spectrometric detection for the study of interaction of compounds

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Václav Kašička, CSc.

doc. RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha, 2017



Tato disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a ve skupině Elektromigračních metod v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v letech 2012 – 2017.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.7.2017

.....  
Renáta Konášová





## **Poděkování**

Děkuji za odbornou pomoc a vedení svým školitelům v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, RNDr. PhDr. Ing. Janě Jaklové Dytrtové, Ph.D., a RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc. Neméně významný dík patří RNDr. Dušanu Kovalovi, Ph.D., za pomoc s konstrukčním řešením CE-ESI/MS rozhraní i aparatur pro jejich přípravu. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D., za zapůjčení hmotnostního spektrometru a jeho odborné rady nejen v MS oblasti a také mým kolegyním a kolegům ze skupin Elektromigračních metod a Hmotnostní spektrometrie. Též bych chtěla poděkovat mému konzultantovi, doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D.

Velký dík patří mé rodině a zejména mému manželovi, Jakubu Konášovi, za trpělivost a podporu během celého mého studia.

Za finanční podporu bych chtěla poděkovat ÚOCHB AV ČR, výzkumnému projektu RVO 61388963, Univerzitě Karlově, projektu SVV 260440 a též Grantové agentuře Univerzity Karlovy, projektu č. 134215, a Grantové agentuře ČR, projektům č. 13-17224S, 13-21409P a 15-01948S, bez nichž by práce nemohla vzniknout.

## **Abstrakt**

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce účinná separační metoda založená na rozdílné rychlosti pohybu iontů v kapalném prostředí v elektrickém poli. Běžně se používá v analytických laboratořích a díky odlišnému principu separace slouží jako komplementární metoda k chromatografickým metodám (zejména HPLC a UHPLC). Vedle využití CE pro kvantitativní/kvalitativní analýzu lze tuto metodu také použít pro studium fyzikálně-chemických vlastností látek, např. pro stanovení aciditních konstant slabých elektrolytů či konstant stability komplexů. Tato práce se zabývá využitím CE metod s UV fotometrickou detekcí (CE-UV) pro stanovení fyzikálně chemických charakteristik látek (aciditní konstanty fungicidů a konstanty stability komplexů dibenzo-18-crown-6, benzo-18-crown-6 a 18-crown-6 etherů s ionty kovů v hydroorganických směsných rozpouštědlech) a možnostmi využití afinitní CE s hmotnostně spektrometrickou detekcí s ionizací elektrosprejem (ACE-ESI/MS) pro studium nekovalentních interakcí látek. Pro spojení ACE-ESI/MS byla testována dvě rozhraní: i) rozhraní s porézní špičkou a ii) rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny. Byla studována schopnost připravených CE-MS rozhraní efektivně oddělit sprejovací napětí od napětí separačního a citlivost těchto rozhraní pro studované analyty. Konstanty stability vybraných referenčních komplexů crown etherů s iontem draslíku byly stanoveny za použití obou uvedených CE-MS rozhraní a byly srovnány s konstantami stability těchto komplexů stanovenými pomocí ACE s UV fotometrickou detekcí. Bylo zjištěno, že sprejovací napětí bylo efektivně odděleno od napětí separačního jen v případě rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny. Toto rozhraní také umožnilo citlivější detekci uvedených komplexů než rozhraní s porézní špičkou a poskytovalo přesnější a správnější hodnoty konstant stability než rozhraní s porézní špičkou. CE experimenty s ESI/MS detekcí navíc umožnily stanovit konstantu stability komplexu ( $K^+$ -18-crown-6), který není detekovatelný UV/vis detektory.

## **Klíčová slova**

kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, CE-ESI/MS rozhraní, konstanta stability

## Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is highly efficient separation method based on the different migration velocity of ions in liquid media in electric field. It is commonly used in analytical laboratories and due to the different separation principle it is applied as a complementary method to the chromatographic methods (HPLC and UHPLC). Beside the applicability of CE for quantitative/qualitative analysis, the method can be used also for physico-chemical characterization of compounds (e.g. determination of acid dissociation constants of weak electrolytes or stability constants of complexes). This work is focused on the applicability of CE methods for determination of physico-chemical characteristic of compounds (acid dissociation constants of triazole fungicides and stability constants of dibenzo-18-crown-6, benzo-18-crown-6 and 18-crown-6 ether complexes with metal ions in hydro-organic solvent mixtures) and on the possibility to use affinity CE (ACE) with electrospray ionization-mass spectrometric detection (ACE-ESI/MS) for the study of non-covalent interactions of compounds. For the online hyphenation of CE and ESI/MS, two highly sensitive CE-ESI/MS interfaces were tested: i) porous tip and ii) nano-sheath liquid flow. The ability of the CE-ESI/MS interfaces to effectively decouple spray and separation voltage and sensitivity of the interfaces were tested. Stability constants of selected reference potassium-crown ether complexes were determined by ACE-ESI/MS detection with both CE-ESI/MS interfaces and compared to the stability constants determined by ACE-UV. It was found that the spray voltage was effectively decoupled in the case of nano-sheath liquid flow CE-ESI/MS interface. The sensitivity, accuracy and reproducibility of this CE-ESI/MS interface were better than those of porous tip interface. Moreover, the measurements using the ESI/MS detection allowed determination of stability constant potassium-crown ether complex ( $K^+$ -18-crown-6), which cannot be detected by UV/vis method.

## Keywords

capillary electrophoresis, mass spectrometry, CE-ESI/MS interfaces, stability constants

## Obsah

1	Úvod.....	14
1.1	Cíle práce.....	16
2	Teoretická část .....	17
2.1	Kapilární elektroforéza.....	17
2.1.1	Pohyb iontu v elektrickém poli.....	17
2.1.2	Elektroosmotický tok .....	19
2.1.3	Markery elektroosmotického toku .....	20
2.1.4	Rozpouštědla v CE.....	21
2.1.5	Detekce v CE .....	23
2.2	Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií – publikace I	25
2.2.1	Ionizační techniky používané v CE-MS .....	26
2.2.2	Rozhraní pro <i>online</i> CE-ESI/MS .....	28
2.3	Metody CE pro stanovení konstant stability komplexů .....	32
2.3.1	Afinitní kapilární elektroforéza .....	32
3	Experimentální část.....	35
3.1	Chemikálie .....	35
3.2	Přístrojové vybavení.....	35
3.3	Postup přípravy CE-MS rozhraní.....	36
3.3.1	Příprava CE kapiláry s porézní špičkou – Moiniho design.....	36
3.3.2	Příprava rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny – Dovichiho design .....	37
3.4	CE měření.....	38
4	Výsledky a diskuse .....	40
4.1	Rozhraní pro CE-ESI/MS.....	40
4.1.1	Příprava CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou .....	41

4.1.2	Optimalizace sprejovacích podmínek pro rozhraní s porézní špičkou .	46
4.1.3	Příprava rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny .....	49
4.1.4	Optimalizace sprejovacích podmínek pro rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny.....	51
4.2	EOF markery pro ACE-MS.....	53
4.2.1	Stanovení $pK_a$ triazolových fungicidů - publikace III .....	54
4.2.2	Afinita triazolových fungicidů k alkalickým kovům.....	57
4.3	Stanovení konstant stability komplexů .....	60
4.3.1	ACE-UV .....	60
4.3.2	ACE-ESI/MS - publikace V .....	64
5	Závěr .....	75
6	Literatura.....	76
7	Přílohy.....	88

## Použité symboly a zkratky

$A, B$	Debye – Hückelovy parametry
$a_{0,i}$	parametr velikosti iontu $i$
$a_i$	aktivitní koeficient iontu $i$
$c$	analytická koncentrace
$d_{\text{CE-MS}}$	vzdálenost mezi ústím separační kapiláry a vstupem do MS
$e$	elementární náboj [ $1,602 \times 10^{-19}$ C]
$E$	intenzita elektrického pole
$I$	iontová síla
$K$	rovnovážná konstanta reakce
$l_{\text{ef}}$	efektivní délka kapiláry (od počátku kapiláry k detektoru)
$l_{\text{tot}}$	celková délka kapiláry
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$N$	počet teoretických pater
$R$	elektrický odpor
$r$	poloměr sprejovací kapiláry
$T$	absolutní teplota
$t_{\text{mig}}$	migrační čas
$U$	elektrické napětí
$U_{\text{sep}}$	separační napětí
$U_{\text{spray}}$	sprejovací napětí
$\gamma_i$	aktivitní koeficient
$\epsilon_r$	relativní permitivita

$\eta$	viskozita
$\lambda$	vlnová délka
$\mu$	pohyblivost
$\rho$	hustota
18c6	18-crown-6 ether
ACE	afinitní kapilární elektroforéza (Affinity Capillary Electrophoresis)
ACN	acetonitril
AcO <sup>-</sup>	acetát
b18c6	benzo-18-crown-6 ether
BSC	vnitřně nepokrytá křemenná kapilára (Bare Silica Capillary)
C4D	bezkontaktní vodivostní detektor (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector)
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CID	kolizně indukovaná disociace (Collision Induced Dissociation)
db18c6	dibenzo-18-crown-6 ether
DHO	Debye-Hückel-Onsagerova teorie
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok (ElectroOsmotic Flow)
EtOH	ethanol
HV	vysoké napětí (High Voltage)
ID	vnitřní průměr (Internal Diameter)
LS	leptací směs

m/z	poměr relativní molekulové hmotnosti a nábojového čísla
MeOH	methanol
MM	mobilitní marker
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
OD	vnější průměr (Outer Diameter)
p-I-BP <sup>+</sup>	p-I-benzylpyridiniový kation
Pr2OH	propan-2-ol
S/N	poměr signál/šum (Signal/Noise ratio)
SD	směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SL	pomocná kapalina (Sheath Liquid)
TF	triazolové fungicidy
TIC	celkový iontový proud (Total Ion Current)



## Prohlášení o spoluautorství

Prohlašuji, že se Mgr. Renáta Konášová podílela na níže uvedených publikacích měrou uvedenou v závorkách.

I. Norková, Renáta; Jaklová Dytrtová, Jana; Kašička, Václav: Ionization Techniques and Interfaces for Coupling of Capillary Electromigration Methods with Mass Spectrometry Detection. *Chemické Listy*, 2013, 107, 949-955.

*Tato práce získala cenu Karla Preise za nejlepší práci v ročníku Chemických listů.*

(75 %)

II. Jaklová Dytrtová, Jana; Fanfrlík, Jindřich; Norková, Renáta; Jakl Michal, Hobza Pavel: Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 359, 38-43.

(10 %)

III. Konášová, Renáta; Jaklová Dytrtová, Jana; Kašička, Václav: Determination of acid dissociation constants of triazole fungicides by pressure assisted capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1408, 243-249.

(80 %)

IV. Konášová, Renáta; Jaklová Dytrtová, Jana; Kašička, Václav: Study of solvent effects on stability constant and ionic mobility of dibenzo-18-crown-6 complex with potassium ion by affinity capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 2016, 39, 4429-4438.

(80 %)

V. Konášová, Renáta; Koval, Dušan, Jaklová Dytrtová, Jana; Kašička, Václav: Comparative study of two CE-MS interfaces for determination of stability constants of potassium-crown ether complexes by ACE-ESI/MS. *připravuje se*

(70 %)

.....  
RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.

## 1 Úvod

Nekovalentní interakce látek v kapalně fázi i na rozhraní kapalně a pevné fáze hrají velmi důležitou roli v mnoha biologických procesech i chemických reakcích; proto jsou intenzivně studovány v řadě oblastí vědeckého výzkumu. Znalost fyzikálně-chemických charakteristik interakcí umožňuje vytvářet simulace reakcí či optimalizovat postupy (katalýza, separace apod.). Mezi základní fyzikálně-chemické charakteristiky komplexů patří jejich stechiometrie a kinetika a rovnovážná konstanta reakce jejich vzniku – konstanta stability komplexu.

V současné době existuje množství metod využívaných pro studium nekovalentních interakcí. Mezi nejběžnější patří chromatografie [1-3], elektromigrační metody [4-6], elektrochemické metody [7], nukleární magnetická rezonance (NMR) [1], hmotnostní spektrometrie (MS) [5, 8] či UV/vis spektrofotometrie [9]. Vedle odlišností v principech stanovení se uvedené metody liší ve spotřebě analytů a rozpouštědel, nárocích na čistotu analytů a v přesnosti získaných hodnot.

V mnoha případech je právě spotřeba analytů limitujícím faktorem, a to zejména kvůli obtížnosti jejich získávání. Z výše uvedených metod se velmi nízkou spotřebou analytů (ale též rozpouštědel) vyznačují kapilární elektromigrační (CE) metody, u nichž se spotřeba analytů pohybuje v řádech pikomol. Vhodnost CE metod pro studium nekovalentních interakcí se liší zejména v závislosti na kinetických a termodynamických parametrech vznikajících komplexů a na jejich stechiometrii [4, 10, 11].

Nejběžněji používanou CE metodou je afinitní kapilární elektroforéza (ACE), která je vhodná ke studiu kineticky labilních komplexů s neměnnou stechiometrií. Stanovení konstant stability organo-metalických komplexů,  $K_{st}$ , pomocí ACE je založeno na měření závislosti efektivní pohyblivosti ligandu (dávkového jako analyt do kapiláry) na koncentraci iontů kovů v základním elektrolytu (BGE). Pro zlepšení správnosti metody byly vyvinuty různé přístupy umožňující korigovat změřené pohyblivosti na změnu teploty uvnitř kapiláry způsobenou Jouleovým teplem či na změnu iontové síly elektrolytu vlivem přídavku iontů do BGE [12]. Vývoj počítačových programů umožnil získání  $K_{st}$  správnější nelineární regresní analýzou naměřených dat než linearizovanými výnosy [13, 14] a proložení získaných píků Haarhoff-Van der Lindeho funkcí (HVL) pro správný odečet migračních časů analytů [15, 16].

I přes uvedená zpřesnění je použitelnost ACE stále limitována pro stanovení  $K_{st}$  slabých a středně silných komplexů ( $\log K_{st} \in \langle 1; 4 \rangle$ ). Toto omezení souvisí s relativně nízkými citlivostmi UV/vis fotometrických detektorů běžně používaných v ACE. Pro zajištění správnosti stanovení  $K_{st}$  metodou ACE je zapotřebí, aby byla koncentrace ligandu dávkovaného do kapiláry jako analyt alespoň o dva řády nižší, než je koncentrace iontů kovů přidávaných do BGE (viz kapitola 2.3). Za předpokladu, že jsou citlivosti běžných UV/vis detektorů v řádech  $10^{-5}$  M, je tato podmínka splněna pro koncentrace kovů v BGE v řádech mM. V tomto koncentračním rozsahu pak lze spolehlivě stanovit  $K_{st}$  v rozsahu  $\log K_{st} 1 - 4$ .

Pro rozšíření použitelnosti metody ke stanovení  $K_{st}$  velmi silných komplexů je tedy potřeba využití velmi citlivých detektorů, jako jsou fluorescenční či MS detektory. Zatímco pro fluorescenční detekci je potřeba, aby analyty byly schopné fluorescence samy o sobě nebo po derivatizaci, MS detektory jsou univerzální. V současné době je přímé spojení kapilární elektroforézy s MS detekcí využíváno v proteomice [17, 18], metabolomice [19, 20], forenzní analýze [21], analýze léčiv [22] a potravin [23] i v dalších oblastech. Pro stanovení konstant stability komplexů se přímé spojení ACE s MS využívá jen zřídka. Ve většině případů, kdy byla ACE-MS využita pro stanovení konstant stability komplexů, se jednalo o spojení využívající ionizaci v indukčně vázaném plazmatu ACE-ICP/MS [24, 25], popř. ionizaci elektrosprejem (ACE-ESI/MS) s koaxiálně proudící pomocnou kapalinou [26] (viz dále). Uvedené práce dokládají vhodnost ACE-MS pro stanovení konstant stability komplexů. Použití CE-ESI/MS rozhraní s koaxiálně proudící kapalinou však neznamená výrazné zlepšení, jelikož zde dochází k výraznému ředění zón analytů [27]. Pro ACE-ESI/MS měření je zapotřebí citlivějších CE-MS rozhraní.

V současné době se mezi nejcitlivější CE-MS rozhraní řadí rozhraní navržená ve skupinách Moiniho [28] – rozhraní s porézní špičkou a Dovichiho [29] – rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny (viz kapitola 2.2.2). Tato uspořádání již byla úspěšně testována pro separace nízko- i vysokomolekulárních látek. Jejich použití pro afinitní měření však zatím (pokud je nám známo) nebylo popsáno.

V této práci jsou podrobně popsány postupy výroby dvou typů vysoce citlivých CE-ESI/MS rozhraní a jsou diskutovány jejich výhody a omezení pro některé aplikace kapilární elektroforézy při studiu nekovalentních interakcí látek.

## 1.1 Cíle práce

Cílem této práce bylo využít spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrickou detekcí s ionizací elektrosprejem (CE-ESI/MS) ke studiu nekovalentních interakcí molekul s využitím dvou vysoce citlivých CE-ESI/MS rozhraní: i) rozhraní bez pomocné kapaliny (tzv. sheath-less) s porézní špičkou a ii) rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny.

V oblasti instrumentace bylo cílem vyvinout postupy přípravy uvedených rozhraní v laboratorních podmínkách.

V oblasti CE-MS analýzy dílčími cíli bylo:

- Optimalizovat přípravy CE-ESI/MS rozhraní.
- Optimalizovat sprejovací podmínky tak, aby zvolené parametry byly dostatečně robustní při průtocích běžných v CE ( $\sim 10^1$  nL min<sup>-1</sup>).
- Nalézt vhodné markery elektroosmotického toku.
- Porovnat citlivost rozhraní bez pomocné kapaliny a rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny.
- Porovnat vhodnost výše uvedených CE-MS rozhraní pro studium nekovalentních interakcí.

V oblasti studia nekovalentních interakcí bylo cílem:

- Studovat vliv rozpouštědla na konstantu stability komplexu dibenzo-18-crown-6 etheru s K<sup>+</sup> iontem.
- Stanovit konstanty stability komplexů crown etherů (dibenzo-18-crown-6, benzo-18-crown-6 a 18-crown-6) s K<sup>+</sup> iontem v hydro-organických rozpouštědlech metodami ACE-UV a ACE-ESI/MS s výše uvedenými dvěma typy rozhraní.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce účinná separační metoda založená na migraci iontů v roztoku v elektrickém poli, která v závislosti na zvolených separačních podmínkách dosahuje separační účinnosti až  $10^6$  teoretických pater. Patří mezi elektromigrační metody, jež jsou pro separaci látek využívány již od třicátých let 20. století [30]. V kapilárním uspořádání však začala být elektroforéza používána až od počátku osmdesátých let [31, 32]. V současné době je uznávaným protějškem metod kapalinové chromatografie (zejména HPLC a UHPLC). Nachází široké uplatnění ve farmaceutické [33], forenzní [34] a klinické analýze [35], dále pak v environmentální analýze a analýze potravin [23, 36]. Běžnými analyty bývají vysokomolekulární látky, jako jsou proteiny [37, 38] a peptidy [37, 39], či nízkomolekulární látky jako jsou léčiva [33, 40].

Uplatnění nachází také při stanovení některých fyzikálně-chemických charakteristik, jako jsou kyselé disociační konstanty slabých elektrolytů [41, 42] či konstant stability komplexů [4-6, 10-13].

CE separace jsou běžně prováděny v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 25 – 100  $\mu\text{m}$  a délce 10 – 100 cm. S tím souvisí velmi malá spotřeba vzorku (piko- až femtomoly analytů v nanolitrových objemech) a rozpouštědel, což je spolu s vysokou separační účinností výhodou CE ve srovnání s chromatografickými technikami. Dalšími výhodami CE jsou pak relativně krátká doba separace, obvykle 5 - 20 minut, a automatizovatelná instrumentace.

#### 2.1.1 Pohyb iontu v elektrickém poli

V homogenním elektrickém poli o intenzitě  $E$  je ion  $i$  s nábojem  $q_i$  uváděn do pohybu (akcelerační) silou elektrického pole  $F_e$ :

$$F_e = q_i E = z_i e E \quad (2.1)$$

kde  $z_i$  je nábojové číslo iontu  $i$  a  $e$  je elementární náboj. Proti směru působení síly  $F_e$  však působí frikční síla  $F_f$ , která brzdí tento pohyb. Velikost této brzdící síly je úměrná rychlosti pohybu iontu,  $v_i$ , poloměru iontu včetně solvatační vrstvy (Stokesův poloměr),

$r_i$ , a viskozitě kapalného prostředí,  $\eta$ . Vztah mezi velikostí síly  $F_f$  a uvedenými veličinami popisuje Stokesův zákon:

$$F_f = -6\pi r_i v_i \eta \quad (2.2)$$

Velmi krátce po připojení elektrického pole o intenzitě  $E$  dojde k vyrovnání těchto proti sobě působících sil ( $F_e = -F_f$ ). V tomto ustáleném stavu se ion pohybuje rychlostí  $v_i$ , která je dána vztahem:

$$v_i = \frac{z_i e}{6\pi r_i \eta} E = \mu_i E \quad (2.3)$$

kde  $\mu_i$  je pohyblivost iontu  $i$ . Z rovnice (2.3) vyplývá, že pohyblivost iontu závisí na jeho náboji, velikosti a viskozitě prostředí. V reálných roztocích se však uplatňují ještě elektrostatické interakce s ostatními ionty, acidobazické rovnováhy či nekovalentní interakce s látkami přítomnými v základním (nosném) elektrolytu (BGE). Pohyblivosti jsou tedy závislé na experimentálních podmínkách. V souvislosti s elektroforetickými experimenty rozlišujeme několik typů pohyblivostí: (i) limitní iontová pohyblivost, (ii) aktuální iontová pohyblivost, (iii) efektivní pohyblivost analytu a (iv) zdánlivá pohyblivost analytu:

*Limitní iontová pohyblivost*,  $\mu_{i,0}$ , je pohyblivost iontu v nekonečně zředěném roztoku o iontové síle  $I \rightarrow 0$ .  $\mu_{i,0}$  závisí na teplotě a typu rozpouštědla (souvisí s různými solvatačními vlastnostmi rozpouštědel) a pro běžné ionty bývá tabelována. Pro malé ionty při nekonečném zředění přibližně platí, že součin jejich limitní iontové pohyblivosti a viskozity rozpouštědla,  $\eta$ , je konstantní ( $\mu_{i,0} \times \eta = \text{konst.}$ ) – Waldenovo pravidlo [43].

*Aktuální iontová pohyblivost*,  $\mu_{i,\text{act}}$ , je pohyblivost iontu  $i$  v roztoku o dané viskozitě, relativní permitivitě,  $\epsilon_r$ , teplotě,  $T$ , a iontové síle,  $I$ . Obecně platí, že s rostoucí iontovou silou  $\mu_{i,\text{act}}$  klesá. Závislost  $\mu_{i,\text{act}}$  na vlastnostech rozpouštědla a iontové síle,  $I$ , popisuje rozšířená Debye-Hückel-Onsagerova (DHO) teorie [44, 45]:

$$\mu_{i,\text{act}} = \mu_{i,0} - \left[ \frac{8,204 \cdot 10^5}{(\epsilon_r T)^{3/2}} \mu_{i,0} + \frac{4,275}{\eta (\epsilon_r T)^{1/2}} \right] \frac{\sqrt{I}}{1 + 502,9 (\epsilon_r T)^{-1/2} a_{0,i} \sqrt{I}} \quad (2.4)$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (2.5)$$

kde  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita rozpouštědla,  $T$  je absolutní teplota,  $a_{0,i}$  ( $[a_{0,i}] = \text{nm}$ ) je součet Stokesových poloměrů iontu  $i$  a protiiontu,  $c_i$  je koncentrace iontu  $i$  a  $z_i$  je nábojové číslo iontu  $i$ .

*Efektivní pohyblivost analytu A*,  $\mu_{A,ef}$ , je definovaná pro analyt, který je slabý elektrolyt, nebo kineticky labilní komplex (viz dále). Pohyblivost takovéto látky je brána jako souhrnná pohyblivost všech iontových forem analytu A, tedy suma pohyblivostí jednotlivých iontových forem vážených molárním zlomkem těchto iontových forem,  $x_i$ :

$$\mu_{A,ef} = \sum_{i=1}^n \mu_i x_i \quad (2.6)$$

Z CE experimentů lze  $\mu_{A,ef}$  získat z migračních časů zón analytů,  $t_{mig,A}$ , markerů elektroosmotického toku,  $t_{EOF}$ , a ze separačního napětí,  $U_{sep}$  (rovnice (2.7)):

$$\mu_{A,ef} = \frac{l_{tot} l_{ef}}{U_{sep}} \left( \frac{1}{t_{mig,A}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (2.7)$$

kde  $l_{tot}$  a  $l_{ef}$  jsou celková a efektivní délka separační kapiláry.

*Zdánlivá (aparentní) pohyblivost*,  $\mu_{A,app}$ , je celková pohyblivost analytu. Závisí na efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu a nespecifické pohyblivosti elektroosmotického toku,  $\mu_{EOF}$ .

$$\mu_{A,app} = \frac{l_{tot} l_{ef}}{t_{mig,A} U_{sep}} = \mu_{A,ef} + \mu_{EOF} \quad (2.8)$$

### 2.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (*electroosmotic flow*, EOF) je jev, který často doprovází elektroforetická měření. Je to neselektivní hnací síla, která unáší všechny přítomné látky (neutrální i nabitě) stejnou rychlostí, čímž významně ovlivňuje dobu analýzy.

V CE experimentech jsou nejčastěji používány křemenné kapiláry. Je to zejména kvůli velmi dobrým elektricky izolačním, optickým a tepelným vlastnostem křemene. Vnitřní stěna nepokryté křemenné kapiláry obsahuje silanolové skupiny (Si-OH), které se ve vodném roztoku základního elektrolytu chovají jako kyseliny s  $pK_a$  2-3. V elektrolytu o  $pH > 3$  jsou disociovány na Si-O<sup>-</sup> a stěna kapiláry nese negativní náboj, ke kterému jsou přitahovány kationty z roztoku a anionty jsou odpuzovány. Takovému

rozložení náboje se říká elektrická dvojvrstva. V první vrstvě (nejblíže ke stěně) jsou kationty přitahovány tak silně, že vytvářejí statickou, tzv. Sternovu vrstvu. V následující, difúzní vrstvě jsou již kationty přitahovány slaběji a mohou se pohybovat v elektrolytu, ale stále je zde přebytek kladného náboje. Působením stejnosměrného elektrického pole v podélném směru kapiláry je difúzní část uvedena do pohybu a spolu s ní je díky vnitřnímu tření uveden do pohybu veškerý roztok v kapiláře a vzniká elektroosmotický tok.

Rozdělením náboje v blízkosti stěny kapiláry se vytváří potenciálový rozdíl mezi stěnou kapiláry a roztokem elektrolytu. Největší záporný potenciál je lokalizovaný na stěně kapiláry a exponenciálně klesá se vzdáleností směrem do roztoku. Na rozhraní mezi Sternovou a difúzní vrstvou je tzv. rovina stříhu, která má tzv. elektrokinetický (zeta,  $\zeta$ ) potenciál. Na velikosti tohoto potenciálu závisí rychlost EOF,  $v_{EOF}$ , podle Smoluchowského rovnice (2.9).

$$v_{EOF} = \frac{-\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (2.9)$$

kde  $\varepsilon_r$  a  $\varepsilon_0$  jsou relativní permitivita rozpouštědla a permitivita vakua. Velikost  $\zeta$  je určena povrchovou hustotou náboje na stěně kapiláry, iontovou silou elektrolytu a tloušťkou difúzní vrstvy.

Na rychlost EOF má vliv způsob preekvilibrace povrchu vnitřní stěny kapiláry [46] a složení nosného elektrolytu (BGE) [47]. EOF lze regulovat modifikací povrchu vnitřní stěny kapiláry (tzv. coatingy) [48-50] nebo také vnějším polem [51]. Na rozdíl od hydrodynamického toku má EOF téměř pravoúhlý rychlostní profil, a tudíž je jeho příspěvek k celkové disperzi zón většinou velmi malý.

### 2.1.3 Markery elektroosmotického toku

Některá elektroforetická měření (jako např. stanovení konstant acidity nebo stability) vyžadují znalost elektroosmotické pohyblivosti BGE v kapiláře,  $\mu_{EOF}$ . V CE je navíc běžné (zejména v nepokrytých křemenných kapilárách), že  $\mu_{EOF}$  je proměnlivá a liší se mezi jednotlivými analýzami [52]. Proto je pro identifikaci zón analytů v CE výhodnější použití  $\mu_{A,ef}$ , která je v daném systému charakteristická pro jednotlivé látky [53, 54]. Pro výpočet  $\mu_{A,ef}$  je však důležitá znalost  $\mu_{EOF}$ . Existuje několik přístupů ke stanovení  $\mu_{EOF}$  [55]. Běžně se používá tzv. Vighova metoda [56], avšak kvůli nestabilitě EOF



(zejména v nepokrytých křemenných kapilárách) [52] je často výhodnější použití neutrální látky (markeru), která se dávkuje do kapiláry spolu se vzorkem. Jelikož je elektroforetická pohyblivost neutrální látky nulová, pak její pohyblivost změřená po vložení separačního napětí odpovídá  $\mu_{\text{EOF}}$ .

Ideálními markery EOF jsou látky, které (i) jsou rozpustné a neutrální v celém rozsahu pH, ve kterém probíhají CE měření, (ii) neinteragují se stěnou kapiláry ani s analytem a žádnou složkou základního elektrolytu (BGE), (iii) dávají dostatečnou odezvu detektoru a (iv) úzké, symetrické píky.

V CE s UV/vis detekcí se jako markery EOF běžně používají mesityloxid [12], dimethylsulfoxid (DMSO) [57], aceton [58], benzylalkohol [59] či thiomocovina [60]. Velkou roli při výběru vhodného EOF markeru pro daný experiment hraje typ použitého rozpouštědla a složení BGE [61]. Za běžných experimentálních podmínek je však často obtížné najít takový EOF marker, který by splňoval všechny výše uvedené podmínky současně.

Zatímco v CE-UV lze většinou použít některou z běžných látek (viz výše), u CE-MS je situace komplikovanější. Běžné EOF markery jsou obvykle nízkomolekulární látky ( $M_r < 100$ ), které jsou obtížně zachytitelné většinou MS analyzátorů, nebo nedochází k jejich ionizaci (neposkytují MS signál). EOF marker pro *online* CE-ESI/MS by měl (kromě podmínek uvedených výše) být snadno ionizovatelný v elektrospreji (viz kapitola 2.2). V ideálním případě by  $m/z$  EOF markeru mělo být blízké  $m/z$  analytů, jelikož pak nedochází ke zbytečnému rozšiřování rozsahu skenovaných  $m/z$ , což vede k vyšší vzorkovací frekvenci MS analyzátoru.

#### 2.1.4 Rozpouštědla v CE

CE separace jsou nejčastěji prováděny ve vodných rozpouštědlech, avšak v některých případech je výhodnější použití organických rozpouštědel nebo jejich směsí.

Rozpouštědla vhodná pro CE separace by měla splňovat následující kritéria:

- chemická stabilita,
- kapalná při běžných experimentálních teplotách,
- relativně nízká viskozita,
- relativně vysoká relativní permitivita,

- dobré solvatační vlastnosti,
- komerční dostupnost ve vysoké čistotě.

Rozpouštědla nejběžněji používaná v CE měřeních a některé jejich vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti rozpouštědel běžně používaných v CE

rozpouštědlo	$\rho$ g mL <sup>-1</sup>	$\eta$ mPa s	$\epsilon_r$	$M$ g mol <sup>-1</sup>	$\gamma$ mN m <sup>-1</sup>
voda	0,997	0,890	78,36	18,02	71,8
methanol	0,791	0,551	32,66	32,04	22,3
ethanol	0,789	1,083	24,55	46,07	21,9
acetonitril	0,786	0,341	35,94	41,05	28,3
propan-1-ol	0,803	1,943	20,45	60,1	23,1
propan-2-ol	0,798	2,044	18,0	60,1	21,2
DMSO	1,092	1,991	46,45	78,13	43,0

$\rho$  – hustota,  $\eta$  – viskozita,  $\epsilon_r$  – relativní permitivita,  $M$  – molární hmotnost,

$\gamma$  – povrchové napětí

Čistá organická rozpouštědla se v CE používají zejména v případě separace látek, které jsou velmi málo rozpustné nebo nerozpustné ve vodných roztocích či k podpoření polárních interakcí (např. interakce analyt-selektor u chirálních separací) [62]. Elektrolyty rozpuštěné v organických rozpouštědlech bývají často také výrazně méně vodivé [63], což umožňuje použití vyšších separačních napětí,  $U_{sep}$ , aniž by docházelo k významnějšímu zahřívání Jouleovým teplem. Na velikosti použitého separačního napětí závisí počet teoretických pater,  $N$ , který je v CE v ideálním případě definován rovnicí (2.10). Použití organických rozpouštědel tedy může zvýšit separační účinnost metody.

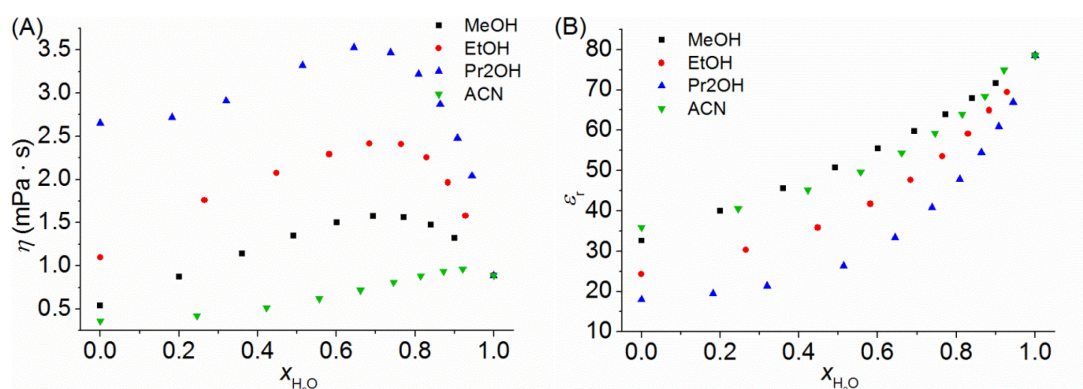
$$N_i = \frac{z_i e U}{2kT} \quad (2.10)$$

Častěji než čistá organická rozpouštědla jsou pro CE separace využívána směsná hydro-organická rozpouštědla. Důvodem jejich využití je zejména zvýšení selektivity separace.

V CE je selektivita separace dvou analytů  $i, j$  charakterizována separačním koeficientem,  $r_{ij}$ , který je definován jako:

$$r_{ij} = \frac{\mu_{i,app}}{\mu_{j,app}} = \frac{\mu_{i,ef} + \mu_{EOF}}{\mu_{j,ef} + \mu_{EOF}} \quad (2.11)$$

Vliv přidavku organického rozpouštědla do BGE na  $r_{ij}$  je komplexní a nelze jednoznačně tvrdit, že separace v nevodných či smíšených rozpouštědlech jsou účinnější [64]. Ve směsných rozpouštědlech jsou (ve srovnání s vodným prostředím) odlišné disociační konstanty slabých elektrolytů a tudíž se mění stupeň disociace analytů (jsou-li slabými elektrolyty) a molární zlomky jejich iontových forem. Změnou složení rozpouštědla dochází ke změně velikosti solvatačního obalu analytu a tudíž i jeho iontové pohyblivosti (rovnice (2.3)). Ve směsných rozpouštědlech je také vyšší disociační konstanta -Si-OH skupiny, což vede ke snížení hustoty povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry. Toto, spolu s nižší relativní permitivitou a vyšší viskozitou hydro-organických směsí (ve srovnání s vodou), vede ke snížení  $\mu_{EOF}$  (viz rovnice (2.9)) [65]. Závislosti viskozity a relativní permitivity hydro-organických směsí na molárním zlomku vody ve směsi jsou na Obr. 1 [66-73].



Obr. 1 Závislost (A) viskozity a (B) relativní permitivity hydro-organických směsí na molárním zlomku vody ve směsi.

### 2.1.5 Detekce v CE

Stejně jako u ostatních separačních technik, i v CE má velký význam druh použité detekční metody. Detektory jsou zařízení, která zaznamenávají změny složení elektrolytu měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Jsou charakterizovány citlivostí, mezí detekce, mezí stanovitelnosti, dynamickým rozsahem, selektivitou,

šumem, driftem, vzorkovací frekvencí či reakční dobou. Nevhodně zvolený detektor může způsobit snížení citlivosti či separační účinnosti metody [74].

V komerčních CE přístrojích se běžně využívá UV/vis spektrofotometrie, fluorescence, či vodivostní detekce [75]. V posledním desetiletí se také intenzivně rozvíjejí metody pro *online* spojení CE s hmotnostně spektrometrickou detekcí [76-78].

### ***Spektrální metody***

Nejčastějším způsobem detekce v CE je UV-spektrofotometrická detekce. Jedná se o do značné míry univerzální způsob detekce, protože většina organických látek absorbuje v oblasti 190-210 nm. V závislosti na schopnostech látek absorbovat UV/vis záření lze pro zvýšení citlivosti volit mezi přímou a nepřímou UV/vis detekcí [75]. Nepřímá detekce se volí v případě separace látek s malými absorpčními koeficienty. Obvykle to jsou anorganické ionty či organické látky bez chromoforů [79]. Přímá, částečně specifická detekce se využívá např. pro detekci bílkovin a peptidů obsahujících ve svém řetězci aromatické aminokyseliny, které absorbují záření při 280-290 nm. Nevýhodou UV/vis detekce je nespecifita a omezení pro použití na kapilárách o malých vnitřních průměrech (nevhodné pro kapiláry s ID < 50 µm).

Výrazně větší citlivost (100 - 1000 x) oproti UV/vis detekci má fluorescenční detekce s klasickými zdroji záření, lasery (laserem indukovaná fluorescence, LIF) [75, 80, 81] nebo světlo emitujícími diodami (light emitting diod, LEDIF) [82]. Je to způsobeno tím, že při průchodu nefluoreskujících složek BGE detektorem má tento detektor jen velmi nízký šum. I v tomto případě se používá přímá i nepřímá detekce, ovšem nepřímá dosahuje LOD výrazně vyšších než přímá detekce [83]. Nevýhodou fluorescenční detekce je častá potřeba (*pre-, in- či post-column*) derivatizace analytů fluorescenčními značkami.

### ***Elektrochemické metody***

Mezi elektrochemické metody detekce patří voltametrie [84], amperometrie [84, 85] a konduktometrie [86-88]. Ačkoliv se jedná o vysoce citlivé metody, v CE nejsou příliš často využívány. Komerčně jsou dostupné pouze CE s univerzální bezkontaktní vodivostní detekcí (C4D) [87]. V případě CE s voltametrickou detekcí bylo

v posledních letech publikováno jen několik prací. Amperometrie je obvykle využívána pro miniaturizovaná zařízení [89], jelikož citlivost amperometrických detektorů roste se zmenšujícími se rozměry elektrod.

Nevýhodami voltametrie a amperometrie je potřeba oddělit separační napětí od napětí vloženého na elektrody detektoru. Toho lze dosáhnout rozdělením toku BGE, nebo umístěním detektoru za separační kapiláru (tzv. *post-column* detekce). Další komplikací je pasivace povrchu elektrod a tudíž nutnost jejich časté aktivace.

### ***Hmotnostní spektrometrie***

Hmotnostně spektrometrické (MS) detektory jsou univerzální a umožňují selektivní a citlivou detekci látek. Citlivost CE-MS metody závisí kromě separačních podmínek také na typu zvoleného CE-MS rozhraní (viz dále a publikace I). Spojení CE-MS se provádí *online* – nejčastěji s ionizací elektrosprejem (ESI) [76], nebo *off-line* – obvykle s využitím ionizace laserem za účasti matrice, MALDI [90]. Nevýhodou *online* MS detekce je omezené množství vhodných BGE. Vhodné BGE jsou tvořeny těkavými elektrolyty, jako jsou např. kyseliny mravenčí, octová a uhličitá a amonné soli těchto kyselin [91].

## **2.2 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií – publikace I**

První experimenty využívající spojení CE s hmotnostně spektrometrickou detekcí (CE-MS) byly provedeny již na konci 80. let minulého století [92] a od té doby je toto spojení intenzivně rozvíjeno. Z počátku bylo využití CE-MS omezeno zejména nízkou citlivostí, nízkou robustností a náročností přípravy stabilního rozhraní. V současné době jsou však již dostupné komerční CE-MS sestavy a metoda se používá pro citlivé analýzy široké škály látek, jako jsou proteiny [93, 94], léčiva [22], polutanty [36] a další analyty [19, 21, 23].

Vysoká citlivost MS detektorů umožňuje použití separačních kapilár o nižším vnitřním průměru (ID). Kapilárami o malém ID protéká nižší elektrický proud (ve srovnání s kapilárami o větších ID), a tudíž jejich použití umožňuje aplikování vyšších separačních napětí bez významného zahřívání vlivem vznikajícího Jouleova tepla.

### 2.2.1 Ionizační techniky používané v CE-MS

Kapilární elektroforéza je metoda, při níž dochází k separaci elektricky nabitých látek, a z tohoto důvodu je nasnadě využití elektrospreje (ESI) jako ionizační techniky pro *online* spojení CE-MS [17]. Díky velmi nízkým průtokům separační kapilárou (obvykle v řádech jednotek až desítek  $\text{nL min}^{-1}$ ) se jedná spíše o nano-ESI [95], který je mnohem méně citlivý na přítomnost solí než klasický ESI [96, 97].

V některých módech CE se však využívají BGE obsahující látky, které v ESI (i nano-ESI) způsobují výrazné snížení poměru signálu k šumu (S/N). Kromě relativně vysokých koncentrací netěkavých solí to bývají tenzidy [98, 99] a iontově párová činidla [98]. Z tohoto důvodu byly testovány i jiné – k těmto látkám tolerantnější – iontové zdroje [100].

Pro spojení micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s MS detekcí byly úspěšně využity ionizační techniky jako je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [101, 102] a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [103]. Tyto iontové zdroje však mají opodstatnění jen v případě MEKC. Hommerson a kol. [104] sledovali čistotu léčiv pomocí různých ionizačních technik pro CE-MS a porovnávali jejich účinnost. Zjistili, že nejlepší odezvy analytů poskytovala právě ESI.

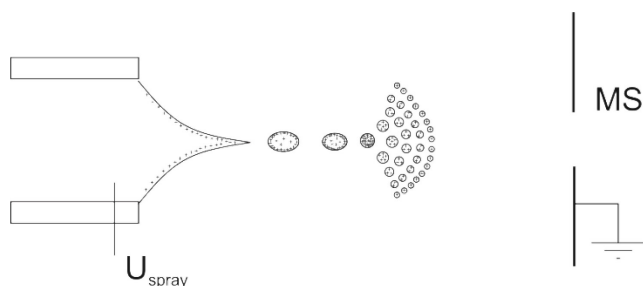
Chang a kol. [105] testovali pro *online* CE-MS ambientní ionizační techniku DART (přímá analýza v reálném čase) a dosáhli srovnatelných detekčních limitů jako ESI. Tato metoda dokonce umožňovala ionizaci více analytů než ESI při použití stejného BGE.

Kromě výše uvedených on-line ionizačních technik se pro spojení CE-MS používají také *off-line* metody jako MALDI [90] nebo DESI (desorpční ionizace elektrosprejem) [106]. V případě obou technik je eluát jímán na tečkovací destičku, ze které je ionizován. Přestože lze těmito technikami dosáhnout vysokých citlivostí [107], nutnost depozice eluátu výrazně snižuje separační účinnost metody.

### **Elektrosprejová ionizace**

Ionizace elektrosprejem je nejčastěji používaná metoda pro *online* spojení CE s MS detekcí [17, 18]. K tvorbě elektrospreje dochází v elektrickém poli mezi sprejovací kapilárou, v níž je roztok obsahující elektrolyty, a protielektrodou, kterou je obvykle vstup do MS. V závislosti na polaritě vloženého napětí lze v ESI generovat kationty i

anionty, pro jednoduchost bude však v následujícím textu uvažována tvorba kladných iontů. Vložením vysokého (kladného) napětí na sprejovací kapiláru dochází k migraci kationů směrem od elektrody – do menisku kapaliny, a aniontů opačným směrem. Tento jev se nazývá elektroforetický efekt. Kationty v menisku jsou přitahovány k protielektrodě a meniskus získává eliptický tvar. Současně však působí povrchové napětí kapaliny, snažící se o co nejmenší velikost povrchu. Vložením dostatečně velkého napětí na sprejovací kapiláru dochází ke vzniku Taylorova kužele a následně elektrospreje (Obr. 2).



Obr. 2 Převod iontů z kapalně do plynné fáze - ionizace elektrosprejem.

Rovnice (2.12) popisuje závislost velikosti napětí (sprejovací napětí,  $U_{\text{spray}}$ ) potřebného ke vzniku elektrospreje na poloměru sprejovací kapiláry,  $r_c$ , povrchovém napětí roztoku,  $\gamma$ , a vzdálenosti sprejovací kapiláry od protielektrody,  $d$ .

$$U_{\text{spray}} = 2 \cdot 10^5 (\gamma r_c)^{1/2} \ln \frac{4d}{r_c} \quad (2.12)$$

Z rovnice (2.12) je zřejmé, že velikost  $U_{\text{spray}}$  nejvíce závisí na poloměru kapiláry a povrchovém napětí roztoku.

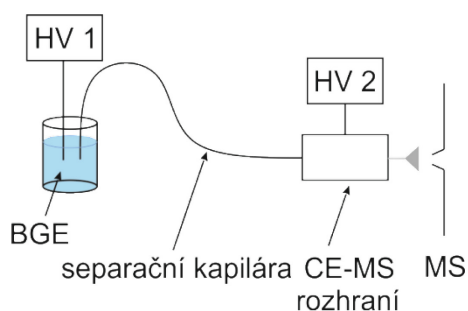
Mechanismus ionizace v elektrospreji je dobře znám a popsán [108]. Velikost primárních kapiček závisí na průtokové rychlosti kapaliny,  $V_f$ , a vlastnostech roztoku. Bylo odvozeno několik přibližných vztahů pro výpočet velikosti kapičky. Jedním ze vztahů, který je v dobré shodě s experimentálními pozorováními, je vztah odvozený Fernandez de la Morou a Loscertalesem [109], rovnice (2.13).

$$R \propto \left( \frac{\epsilon_r V_f}{\kappa} \right)^{1/3} \quad (2.13)$$

kde  $R$  je poloměr kapičky a  $\kappa$  je elektrická vodivost roztoku. Z této rovnice je zřejmé, že velikost primárních kapiček je úměrná průtoku sprejované kapaliny. S velikostí primárně vzniklých kapiček souvisí vliv kontaminantů na signál analytů a výsledný vzhled MS spektra [97].

### 2.2.2 Rozhraní pro online CE-ESI/MS

Ve spojení CE s MS detekcí je MS detektor umístěn za separační kapilárou – tzv. „post column“ detekce. Převod BGE (včetně analytů) vytékajícího ze separační kapiláry do plynné fáze umožňuje CE-MS rozhraní. Schéma spojení CE s MS detekcí je znázorněno na Obr. 3.



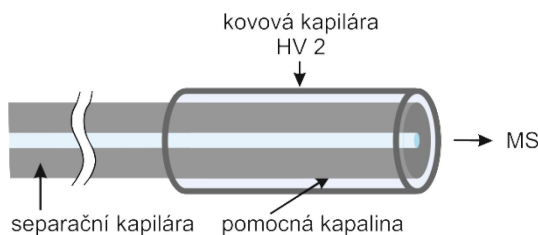
Obr. 3 Schéma spojení CE s MS detekcí; HV 1 – zdroj vysokého napětí pro CE separaci, HV 2 – zdroj vysokého napětí pro ESI.

Sestrojení stabilního a robustního CE-MS rozhraní bylo a stále je největší výzvou v oblasti CE-MS, protože toto rozhraní zajišťuje uzavření elektrického separačního okruhu i ionizaci analytů a jejich vstup do MS detektoru. Optimální CE-ESI/MS rozhraní také umožňuje vytvoření stabilního elektrospreje bez rozmývání a ředění zón analytů. Doposud vyvinutá CE-ESI/MS rozhraní lze rozdělit do tří skupin: (i) rozhraní s pomocnou kapalinou (tzv. *sheath-liquid flow interface*), (ii) rozhraní bez pomocné kapaliny (*sheathless interface*) a (iii) rozhraní využívající kapalinový spoj (*liquid junction interface*).

Konstrukčně nejjednodušší CE-ESI/MS rozhraní je tzv. rozhraní s koaxiálně proudící pomocnou kapalinou. V tomto uspořádání je separační kapilára vložena do kovové sprejovací kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí (Obr. 4). Separací okruh je



uzavřen na ústí separační kapiláry, kde dochází ke smísení pomocné kapaliny (která je v přímém kontaktu s kovovou kapilárou) s BGE.



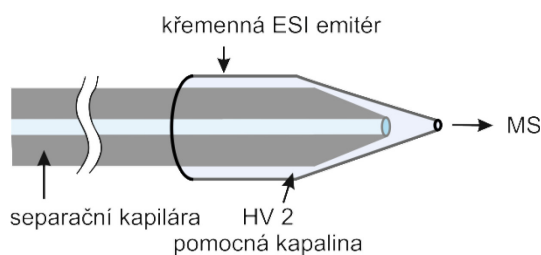
Obr. 4 Schéma rozhraní s pomocnou kapalinou.

Velmi malý elektrický odpor pomocné kapaliny mezi ústím separační kapiláry a kovovou kapilárou zajišťuje, že sprejovací napětí je stejné jako napětí vložené na kovovou kapiláru. Toto uspořádání zajišťuje nezávislost velikosti sprejovacího napětí na velikosti separačního napětí.

Výhodou tohoto rozhraní je jeho robustnost, jednoduchost a zejména oddělení (tzv. „*decoupling*“) separačního a sprejovacího napětí, tj. výše zmíněná nezávislost separačního a sprejovacího napětí. K vytvoření stabilního elektrospreje je však potřeba relativně vysokého průtoku pomocné kapaliny ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ), který je o několik řádů vyšší než průtok BGE separační kapilárou ( $\text{nL min}^{-1}$ ), čímž dochází k výraznému ředění separovaných zón. Mísení BGE s pomocnou kapalinou však lze využít ve prospěch citlivosti použitím vhodných modifikátorů zvyšujících ionizovatelnost analytů, které mohou být obsažené v pomocné kapalině [110].

Trochu odlišným uspořádáním lze docílit nižšího zředění a tudíž vyšší citlivosti CE-ESI/MS rozhraní s pomocnou kapalinou. Jednou takovou variantou je umístění CE separační kapiláry do ESI emitéru se zužující se špičkou (Obr. 5) [111]. K uzavření separačního okruhu dochází ve špičce emitéru. Malý objem prostoru mezi ústím CE kapiláry a ústím emitéru způsobuje nižší zředění ve srovnání s klasickým „*sheath-liquid*“ rozhraním. Míru zředění lze navíc ovlivnit rychlostí proudění pomocné kapaliny.

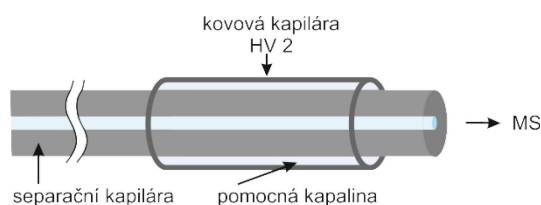
Pro toto uspořádání byly použity dva typy emitéru: (i) emitér ze skla/křemene [29, 111, 112] a (ii) kovový emitér [113].



Obr. 5 Schéma CE-ESI/MS rozhraní s pomocnou kapalinou se spojením ve špičce („junction at the tip“).

Rozdíl ve vlastnostech emitérů z různých materiálů je významný. Z hlediska jejich přípravy je výhodnější emitér skleněný/křemenný, který lze připravit svépomocí. Příprava kovového emitéru se zužující se špičkou je poměrně náročná. Navíc, kovová špička je netransparentní, a tudíž opticky nelze přesně určit pozici separační kapiláry v emitéru. Další výhodou skleněného/křemenného emitéru je schopnost generovat elektroosmotický tok pomocné kapaliny, který lze regulovat volbou vhodného potahu vnitřního povrchu kapiláry (*coatingu*), a jehož rovný profil významně nepřispívá k rozmývání zón. S tímto ovšem souvisí nevýhoda použití skleněných/křemenných emitérů. U kovového emitéru se HV vkládá přímo na emitér a tudíž je sprejovací napětí rovno napětí vloženému na emitér. Sprejovací napětí je tudíž nezávislé na separačním napětí [114]. V případě skleněných/křemenných emitérů v uspořádání dle Dovichiho [29, 111] je však HV vkládáno na elektrodu, která je umístěna mimo emitér a ke špičce emitéru je HV přivedeno prostřednictvím pomocné kapaliny. Elektrický odpor této kapaliny způsobuje, že HV vložené na elektrodu není stejné jako sprejovací napětí na špičce emitéru. Právě tento potenciálový spád umožňuje v některých případech generování elektroosmotického toku. V případě skleněných/křemenných emitérů je tedy sprejovací napětí závislé na velikosti separačního napětí.

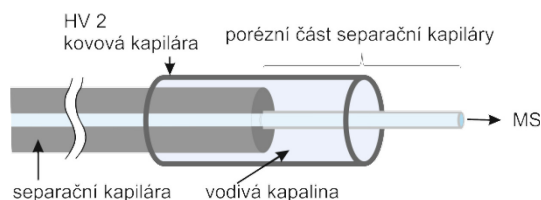
Jinou možnou modifikací rozhraní s pomocnou kapalinou je vysunutí ústí separační křemenné kapiláry vně kovové sprejovací kapiláry (Obr. 6). V tomto uspořádání se Taylorův kužel vytváří na ústí separační kapiláry a nikoliv na kovové kapiláře, jako je tomu v původním uspořádání (Obr. 4). Zmenšení Taylorova kužele vede k menšímu rozmývání zón v CE-ESI/MS rozhraní [115].



Obr. 6 Schéma CE-ESI/MS rozhraní s pomocnou kapalinou s vysunutou separační kapilárou.

Vzhledem k tomu, že použití pomocné kapaliny v CE-ESI/MS snižuje citlivost této metody a tedy i její případné uplatnění v praxi, byla snaha dále směřovat vývoj rozhraní umožňující spojení právě bez pomocné kapaliny, tzv. „*sheathless interfaces*“. Tato rozhraní nevyužívají pomocnou kapalinu mísící se s BGE a elektrický obvod je uzavřen jiným vodivým spojením BGE se zdrojem vysokého napětí. Od počátku vývoje CE-MS rozhraní bylo vyvinuto několik různých uspořádání pro vytvoření vodivého spojení, jako např. pokovení špičky kapiláry, vložení elektrody - tenkého platinového drátku – do ústí separační kapiláry, atd. (viz publikace I). Tato uspořádání však nebyla příliš úspěšná, a to z důvodů jako jsou jejich krátké životnosti, rozmývání píků či náročnost přípravy.

V současné době nejúspěšnějším rozhraním bez pomocné kapaliny, nyní již i komerčně dostupným, je rozhraní navržené M. Moinim [28], tj. rozhraní s porézní špičkou („*porous tip interface*“). V tomto upořádání je separační kapilára na konci naleptaná tak, že tloušťka její stěny je menší než 7  $\mu\text{m}$ . Takto tenká stěna kapiláry je prostupná pro malé ionty, a je tedy i elektricky vodivá. Naleptaný konec separační kapiláry je vsunut do kovové kapiláry, která je naplněna vodivou kapalinou (Obr. 7). Na kovovou kapiláru je zdrojem HV 2 vloženo napětí pro vznik elektrospreje. Separační okruh je uzavřen prostřednictvím vodivé kapaliny přes porézní stěnu kapiláry.



Obr. 7 Schéma CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou.

Nevýhodou tohoto rozhraní je absence „rezervoáru“ BGE na ústí separační kapiláry. Transport iontů přes stěnu kapiláry zatím není definován, nelze tak předpokládat, že je zajištěno konstantní složení BGE v průběhu separace. Stěna kapiláry má také určitý elektrický odpor, tudíž HV vložené na kovovou kapiláru není stejné jako napětí sprejovací. V tomto upořádání tedy není oddělené sprejovací a separační napětí. Vysoká citlivost tohoto rozhraní však značně převyšuje uvedené nevýhody a toto rozhraní je stále častěji používáno pro *online* CE-ESI/MS.

## 2.3 Metody CE pro stanovení konstant stability komplexů

Stanovení konstant stability komplexů lze pomocí kapilární elektroforézy provést několika metodami. Vhodnost jednotlivých metod lze rozlišovat v závislosti na kinetice a termodynamice komplexotvorné reakce do skupin pro (i) kineticky inertní komplexy, (ii) kineticky labilní komplexy (iii) termodynamicky stabilní (silné) komplexy a (iv) termodynamicky nestabilní (slabé) komplexy.

V případě interakcí látek schopných tvořit komplexy s vyššími koordinačními čísly ligandů jsou vhodnými metodami frontální techniky jako je FACE (frontal analysis capillary electrophoresis) [116] nebo FACCE (frontal analysis continuous capillary electrophoresis) [117].

Pro stanovení konstanty stability termodynamicky silných nebo kineticky inertních komplexů lze použít techniku kapilární zónové elektroforézy, kdy je do kapiláry dávkována pre-inkubovaná reakční směs v různých poměrech analyt/ligand [118].

Konstanta stability kineticky labilního komplexu může být stanovena několika metodami kapilární elektroforézy [119], jako je afinitní kapilární elektroforéza (ACE) [120], vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE) [121], metoda dle Hummel-Dryera, a další metody [4]. Nejčastěji používanou metodou je afinitní kapilární elektroforéza, která např. ve srovnání s VACE poskytuje věrohodnější výsledky [6].

### 2.3.1 Afinitní kapilární elektroforéza

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) je metoda umožňující stanovení zdánlivé konstanty stability komplexu v roztoku z migračních časů analytů a markeru EOF.

V případě organometalických komplexů je jeden z interagujících partnerů (např. neutrální ligand) dávkován do kapiláry jako analyt, a druhý interagující partner (kationt kovu) je přidáván do BGE.

### **Zdánlivá konstanta stability komplexu**

Vznik komplexu iontu kovu,  $M^+$ , s neutrálním ligandem popisuje reakce:



Po ustavení rovnováhy je poměr mezi výchozími látkami a produktem charakterizován termodynamickou konstantou stability vzniklého komplexu  $ML^+$ ,  $K_{th,ML}$ :

$$K_{th,ML} = \frac{a_{ML^+}}{a_{M^+} a_L} = \frac{[ML^+]}{[M^+][L]} \frac{\gamma_{ML^+}}{\gamma_{M^+} \gamma_L} \quad (2.15)$$

kde  $a_{ML^+}$ ,  $a_{M^+}$  a  $a_L$  jsou aktivity,  $[ML^+]$ ,  $[M^+]$  a  $[L]$  jsou rovnovážné koncentrace a  $\gamma_{ML^+}$ ,  $\gamma_{M^+}$  a  $\gamma_L$  jsou aktivní koeficienty produktu a reaktantů.

Aktivní koeficienty neutrálních látek jsou jednotkové, avšak v případě iontů v roztoku jsou menší než 1. Jejich hodnota závisí na iontové síle elektrolytu,  $I$ , relativní permitivitě rozpouštědla,  $\epsilon_r$ , teplotě,  $T$ , parametru velikosti iontu,  $a_{0,i}$ , a může být vypočítána s využitím rozšířeného Debye-Hückelova-Onsagerova vztahu (rovnice (2.16)).

$$\log \gamma_i = -\frac{Az_i^2 \sqrt{I}}{1 + Ba_{0,i} \sqrt{I}} \quad (2.16)$$

kde A a B jsou definovány rovnicemi (2.17) a (2.18).

$$A = \frac{1,825 \cdot 10^6}{(\epsilon_r T)^{3/2}} \quad (2.17)$$

$$B = \frac{502,9}{(\epsilon_r T)^{1/2}} \quad (2.18)$$

Ve většině případů je však parametr velikosti iontu neznámý a pro výpočet  $\gamma_i$  malých iontů se volí přibližná hodnota  $a_{0,i} = 0,5$  nm.

Zanedbáním rozdílných velikostí iontů (a tudíž i aktivitních koeficientů) se získá tzv. zdánlivá konstanta stability komplexu ML,  $K_{ML}$ , která je definovaná jako podíl rovnovážných koncentrací produktu a reaktantů (rovnice (2.19)).

$$K_{ML} = \frac{[ML^+]}{[M^+][L]} \quad (2.19)$$

### **Stanovení konstanty stability**

Stanovení  $K_{ML}$  metodou ACE je založeno na změně efektivní pohyblivosti ligandu v závislosti na koncentraci kovu v roztoku (podrobně v publikaci IV). S rostoucí koncentrací kovu v BGE se posouvá rovnováha reakce (2.14) směrem doprava a roste molární zlomek produktu, který je dán vztahem (2.20):

$$x_{ML} = \frac{[ML^+]}{[L] + [ML^+]} \quad (2.20)$$

Závislost efektivní pohyblivosti na molárním zlomku popisuje rovnice (2.6). Vztah mezi efektivní pohyblivostí ligandu a konstantou stability komplexu se získá kombinací rovnic (2.6), (2.19) a (2.20):

$$\mu_{eff,L} = \frac{\mu_{ML} K_{ML} [M^+]}{1 + K_{ML} [M^+]} \quad (2.21)$$

V případě, kdy je analytická (celková) koncentrace iontů kovů ve výrazném přebytku ve srovnání s analytickou koncentrací ligandu (alespoň 2 řády), je změna koncentrace kationtů kovu v důsledku komplexace s ligandem zanedbatelná a rovnovážnou koncentrací kovu lze ztotožnit s koncentrací analytickou:

$$\mu_{eff,L} = \frac{\mu_{ML} K_{ML} c_M}{1 + K_{ML} c_M} \quad (2.22)$$

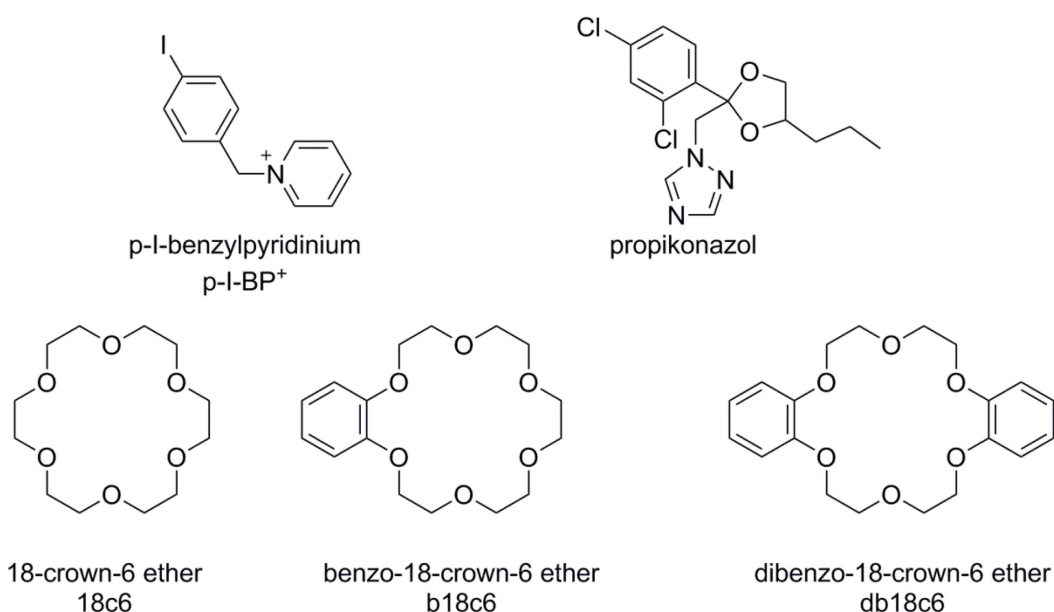
Konstanta stability komplexu se získá nelineární regresní analýzou závislosti  $\mu_{eff,L}$  na analytické koncentraci iontů kovu v BGE s využitím rovnice (2.22).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie

Použité chemikálie byly stupně čistoty p.a.. Rozpouštědla methanol, ethanol, acetonitril i propan-2-ol dosahovala stupně čistoty pro HPLC (Sigma Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika). Použité triazolové fungicidy byly analytickými standardy (Pestanal ®, Sigma Aldrich s.r.o.). p-I-benzylpyridinium chlorid byl syntetizován podle postupu uvedeného v publikaci cit. [122].

Struktury látek použitých pro testování CE-MS rozhraní jsou uvedeny na Obr. 8.



Obr. 8 Struktury testovacích látek.

#### 3.2 Přístrojové vybavení

Měření byla prováděna na komerčním CE analyzátoru s UV/vis spektrofotometrickou detekcí a dvou CE analyzátorech sestavených na ÚOCHB AV ČR pro CE separace s UV a MS detekcí.

Komerční CE analyzátor (Agilent CE 7100, Waldbronn, Německo) byl plně automatizovaný přístroj s aktivním chlazením kazety se separační kapilárou i karuselu s BGE a se vzorky.

Domácí CE aparatura sestrojena na ÚOCHB byla obsluhovaná manuálně, sběr dat a jejich zpracování zajišťovala chromatografická stanice Clarity (DataApex, Praha, ČR). Měření probíhala při 22-25 °C bez aktivního chlazení separační kapiláry. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky a detekován UV detektorem s pevnou vlnovou délkou 206 nm.

Aparatura používaná pro *online* CE-MS sestávala ze dvou vysokonapěťových zdrojů (Spellman High Voltage Electronics Corporation, Hauppauge, NY, USA) a automatického dávkovače sestrojeného na ÚOCHB.

MS experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí LCQ Classic (Thermo Finigan, San Jose, USA) a sběr a zpracování MS dat zajišťoval program Xcalibur.

Přesná měření rozměrů špiček leptaných kapilár byla prováděna pomocí skenovacího elektronového mikroskopu FEI Nova NanoSEM 450 Scanning Electron Microscope.

Pro kontrolní měření a nastavení správné pozice separační kapiláry v ESI emitéru (viz dále) byl použit optický mikroskop Dino-Lite Edge AM4115ZT s nastavitelným polarizátorem (Dino-Lite - digitální mikroskopy, Tachlovice, ČR).

### 3.3 Postup přípravy CE-MS rozhraní

#### 3.3.1 Příprava CE kapiláry s porézní špičkou – Moiniho design

CE kapilára (25 x 150  $\mu\text{m}$ , ID x OD) pro CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou byla připravena podle následujícího postupu:

1. Odstranění 4 cm dlouhého úseku polyimidového vnějšího povlaku kapiláry opálením.
2. Oplach a odstranění zbytků zuhelnatělého polyimidu, osušení proudem vzduchu/dusíku.
3. Leptání ve směsi  $\text{NH}_4\text{F}$  (20 % m/m) + HF (24 % v/v) po dobu 78 min při teplotě 20 °C.
4. Neutralizace zbytků leptací směsi na povrchu kapiláry roztokem  $\text{NH}_4\text{AcO}$  o  $\text{pH} = 9$  a  $I = 0,5 \text{ M}$ .
5. Opláchnutí (voda, methanol) a osušení kapiláry proudem vzduchu/dusíku.
6. Naplnění kapiláry octanem amonným o  $\text{pH} = 4.5$  a  $I = 0,5 \text{ M}$ .



7. Odleptání špičky kapiláry v HF na rozhraní dvou fází (oktanol/voda), průtok octanu amonného  $70 - 80 \text{ nL min}^{-1}$ ,  $t = 1,25 \text{ min}$ .
8. Neutralizace zbytků HF na povrchu kapiláry roztokem octanu amonného o  $\text{pH} = 9$  a  $I = 0,5 \text{ M}$ , odstranění zbytků oktanolu z povrchu kapiláry - oplach sérií rozpouštědel (propan-2-ol, methanol/propan-2-ol (1/1), methanol-acetonitril (1/1), methanol) průtokem  $15 \text{ mL h}^{-1}$  po dobu 20 min.
9. Umístění do kovové kapiláry tak, že 1 cm porézní špičky vyčnívá ven z kapiláry a 1,5 cm porézní špičky je v kontaktu s vodivou kapalinou (5 % AcOH ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O v poměru 1/1) uvnitř kovové kapiláry.

### 3.3.2 Příprava rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny – Dovichiho design

Rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny bylo navrženo ve skupině Dovichiho a je tvořeno dvěma částmi (i) CE kapilárou a (ii) ESI emitérem.

Příprava CE kapiláry o  $25 \times 150 \text{ }\mu\text{m}$  (ID x OD):

1. Odstranění 5 cm dlouhého úseku polyimidového vnějšího povlaku kapiláry opálením.
2. Oplach a odstranění zbytků zuhelnatělého polyimidu, osušení proudem vzduchu/dusíku.
3. Leptání 4 cm od konce kapiláry ve směsi NH<sub>4</sub>F (20 % m/m + HF (24 % v/v) po dobu 58,5 min při teplotě 20 °C.
4. Neutralizace zbytků leptací směsi na povrchu kapiláry v NH<sub>4</sub>AcO o  $\text{pH} = 9$
5. Opláchnutí (voda, methanol) a osušení kapiláry proudem vzduchu/dusíku.
6. Leptání 1 cm od konce kapiláry ve směsi NH<sub>4</sub>F (20 % m/m) + HF (24 % v/v) po dobu 22 min při teplotě 20 °C.
7. Neutralizace zbytků leptací směsi na povrchu kapiláry octanem amonným o  $\text{pH} = 9$ .
8. Opláchnutí (voda, methanol) a osušení kapiláry proudem vzduchu/dusíku.
9. Odstranění zbytku polyimidu leptáním v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za horka, opláchnutí demi vodou.
10. Umístění kapiláry do ESI emitéru.

Příprava ESI emitéru:

Křemenná trubička Vitrotubes (VitroCom, Inc., Mountain Lakes, NJ, USA) o délce 10 cm a 300 x 400  $\mu\text{m}$  (ID x OD) byla vytažena do tvaru ESI emitéru na jednoduché domácí tažičce kapilár. Štěrba, kterou prostupoval plamen z kahanu na kapiláru, byla široká 2 mm. Trubička byla vytažena do požadovaného tvaru pomocí závaží o hmotnosti 165 g. Výsledná špička emitéru měla  $\sim 35 \mu\text{m}$  OD.

### 3.4 CE měření

#### CE-UV

Pro CE měření s UV detekcí při 206 nm byly použity křemenné kapiláry Polymicro Technologies (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) o ID x OD = 50 x 365  $\mu\text{m}$ . Před prvním měřením byl vnitřní povrch kapiláry aktivován proplachem vodou (10 min), NaOH (1 M, 10 min), vodou (15 min). Při každé změně elektrolytu byla kapilára promývána vodou (1 min), NaOH (1M, 1 min), vodou (2 min) a 3 min BGE. Mezi měřeními ve stejném elektrolytu byla kapilára promývána BGE po dobu 1 min. Proplachy byly prováděny tlakem 1000 mbar. Vzorek byl do kapiláry dávkován nízkým tlakem (10-20 mbar, viz publikace III a IV).

Mezi měřeními byly kapiláry uchovávány v demi vodě.

#### CE-MS

Pro CE měření s MS detekcí byly použity kapiláry o ID x OD = 25 x 150  $\mu\text{m}$ . Aktivace povrchu kapiláry probíhala obdobně jako v případě CE-UV, místo NaOH byl použit 2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Při měření s CE-MS rozhraním s porézní špičkou byl při výměně elektrolytů proplachovací krok s  $\text{NH}_4\text{OH}$  nahrazen proplachem AcOH, protože je transport iontů zajišťován zejména prostřednictvím malých iontů ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Proplach alkalickým roztokem vede ke snížení vodivosti porézní špičky a nestabilitě systému.

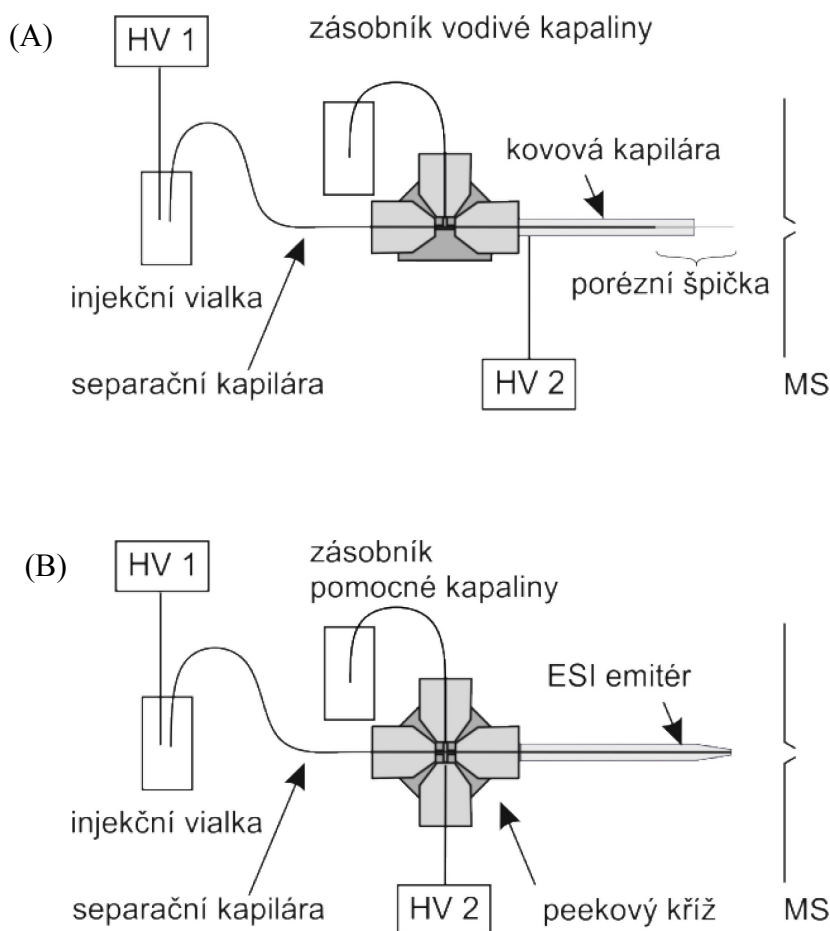
Pomocná kapalina pro rozhraní s nano-tokem byla tvořena octanem amonným v hydro-organické směsi MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (3/2 v/v) o pH\* 5,5 a I = 25 mM. Tok pomocné kapaliny ESI emitérem byl indukován tlakem 50 mbar. Vodivá kapalina pro rozhraní s porézní špičkou byla tvořena 5 % (v/v) kyselinou octovou ve směsi MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v). Vodivá kapalina v kovové kapiláře byla průběžně doplňována hydrodynamickým tokem ( $p = 30 \text{ mbar}$ ).

Separální kapilára s porézní špičkou byla mezi měřeními uchovávána v 0,5 M AcOH. Separální kapilára pro rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny byla uchovávána ve vodě.

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Rozhraní pro CE-ESI/MS

Pro CE-ESI/MS experimenty byla připravena rozhraní s porézní špičkou a rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny. Na Obr. 9 jsou schematicky znázorněna experimentální uspořádání obou rozhraní.



Obr. 9 Schémata CE-ESI/MS rozhraní (A) s porézní špičkou a (B) s nano-tokem pomocné kapaliny; HV 1 – zdroj vysokého napětí pro separaci, HV 2 – zdroj vysokého napětí pro ESI.

V následujícím textu jsou podrobně popsány postupy přípravy uvedených rozhraní, včetně odůvodnění jednotlivých kroků.

#### 4.1.1 Příprava CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou

Příprava konce kapiláry pro rozhraní CE-ESI/MS s porézní špičkou je poměrně složitá a vyžaduje precizní přístup. Příprava sestává z několika kroků (kapitola 3.3.1). Každý z těchto kroků bylo potřeba optimalizovat, aby byl získán požadovaný výsledný produkt.

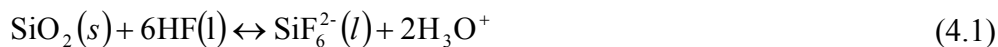
V prvním kroku je zapotřebí odstranit vnější polyimidovou vrstvu (vnější „coating“). Jelikož se jedná o relativně dlouhý úsek (cca 4 cm), nejjednodušší a nejrychlejší je prosté opálení kapiláry v malém plameni (např. běžný zapalovač). V tomto kroku je kritická teplota plamene, jelikož při vysoké teplotě dochází k deformaci (ohybu) kapiláry.

Po odstranění zbytků zuhelnatělého polyimidu a opláchnutí kapiláry je potřeba její povrch důkladně vysušit. Ideální postup je oplach kapiláry methanolem a následné osušení vzduchem. Takto upravená špička je připravena k leptání.

Před ponořením špičky do leptací směsi je potřeba zamezit vniknutí této směsi do vnitřku kapiláry. Tohoto lze docílit např. naplněním kapiláry kapalinou a jejím promýváním v průběhu leptání, nicméně tímto by docházelo k ředění leptací směsi a nerovnoměrnému leptání. Z tohoto důvodu je v této fázi leptání vhodnější použití zvýšeného tlaku uvnitř leptané kapiláry. Druhý konec kapiláry se přes septum umístí do vialky, do níž je přes redukční ventil přiváděn dusík. Tlak uvnitř vialky i kapiláry musí být právě takový, aby z konce kapiláry ponořeného do leptací směsi ještě neunikaly bublinky a zároveň aby leptací směs nevnikala do kapiláry. Tento tlak byl experimentálně určen na 105 - 110 mbar (pro kapiláru s vnitřním průměrem 25  $\mu\text{m}$ ). Probublávání leptací směsi by způsobilo míchání leptací směsi u konce kapiláry a nerovnoměrné leptání povrchu.

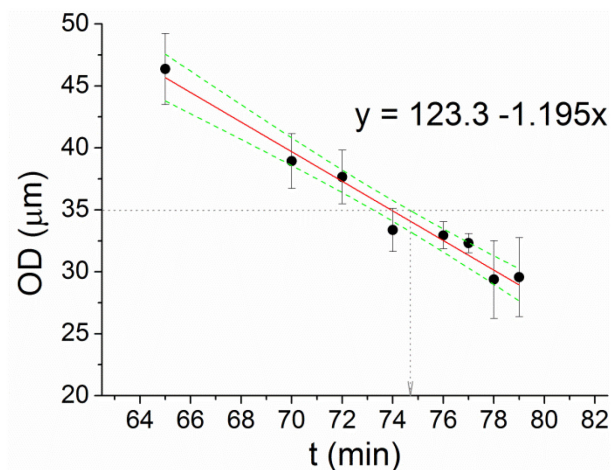
Pro přípravu kapiláry bylo optimalizováno složení leptací směsi. Použití 48 % HF, jak je uváděno v literatuře [28], vede k příliš rychlému leptání povrchu (při 20 °C je kapilára o 25 x 125 ID x OD úplně rozleptaná za 29 min). V tomto případě je tedy obtížné ukončit leptání vždy ve stejný okamžik a opakovatelnost tohoto postupu přípravy kapiláry je velmi nízká. Opakovatelnost přípravy kapiláry s porézní špičkou lze zvýšit použitím směsi o nižší koncentraci HF.

Jelikož leptání křemene probíhá podle rovnice (4.1), je k udržení konstantního pH v průběhu leptání vhodné použití pufru o dostatečné pufrací kapacitě. Tímto je docíleno konstantní rychlosti leptání.



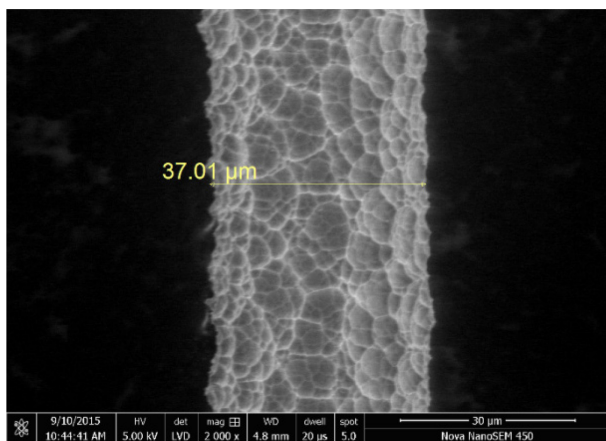
K leptání křemene dochází v roztoku o nízkém pH. Optimální leptací směs je tvořena HF (24 % v/v) a NH<sub>4</sub>F (20 %) (pH = 2,82). Při teplotě 20 °C byla změřena závislost vnějšího průměru kapiláry (OD) na době leptání. Vnější průměr kapilár leptaných po různou dobu (64-80 min, Obr. 10) byl měřen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM).

Na základě provedených CE-MS měření bylo zjištěno, že stěna kapiláry je elektricky vodivá (dochází ke vzniku elektrospreje), je-li její tloušťka < 7 μm.



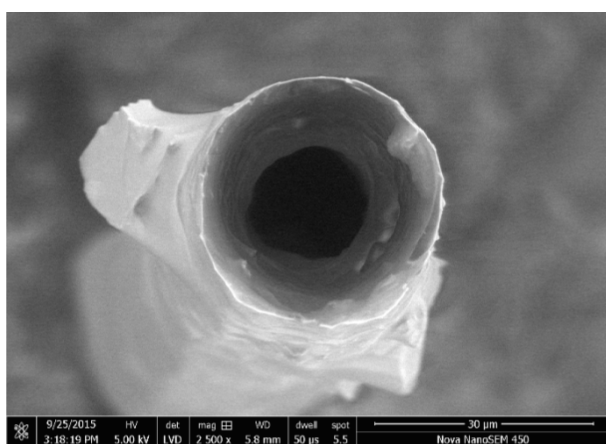
Obr. 10 Závislost vnějšího průměru kapiláry, OD, na době leptání, *t*.

S využitím SEM byl optimalizován i další postup úpravy kapiláry. Bylo zjištěno, že po skončení leptání (vytažení kapiláry z leptací směsi) je třeba neprodleně zneutralizovat zbylou leptací směs, která ulpěla na povrchu kapiláry. V opačném případě leptání pokračuje a výsledkem je nerovný vnější povrch kapiláry (Obr. 11).



*Obr. 11 SEM snímek kapiláry po ukončení leptání bez okamžité neutralizace zbytků leptací směsi na povrchu kapiláry.*

Zvýšený tlak uvnitř kapiláry úplně nezabrání naleptání vnitřního povrchu kapiláry. Krátký úsek na konci kapiláry (~ 1 mm) je naleptán i na vnitřní straně, což má za následek kuželovité rozšiřování konce kapiláry směrem k jejímu ústí (Obr. 12).



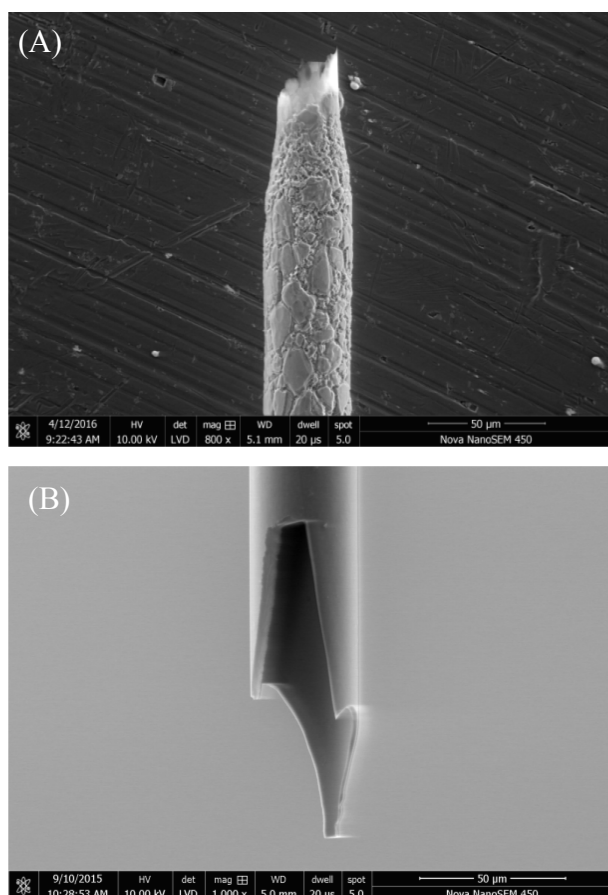
*Obr. 12 SEM snímek ústí leptané kapiláry po prvním stupni leptání.*

Změna vnitřního průměru kapiláry je z hlediska CE nežádoucí, proto je potřeba rozšiřující se špičku odstranit. Leptaná kapilára se upravuje tak, aby výsledná délka porézní špičky byla 2,5 cm. Prosté seřiznutí není dostačující, jelikož kapilára je již velmi křehká a při jejím řezání dochází i k jejímu rozdrčení a ústí separační kapiláry nemá rovný profil, který je důležitý pro vnik stabilního elektrospreje.

Rovný profil byl zajištěn optimalizací druhého kroku leptání.

V této fázi je potřeba účinně zamezit proniknutí leptací směsi dovnitř kapiláry. Toho lze dosáhnout současným promýváním kapiláry kapalinou. Jelikož kapalina vytékající z kapiláry ředí leptací směs, je potřeba leptat rychle. Výhodné je použít k promývání roztok o slabě kyselém pH (např. octan amonný, pH 4,5), aby nedošlo k neutralizaci leptací směsi a tudíž k zastavení leptání. Jelikož je stěna kapiláry velice tenká ( $< 7\mu\text{m}$ ), špička kapiláry je ve 48 % HF úplně odleptaná již za 1,25 min.

Kapilární jevy způsobují vztlínání leptací směsi (LS) po vnějším povrchu kapiláry (vznik menisku), což má za následek kuželovitý tvar špičky kapiláry (Obr. 13).



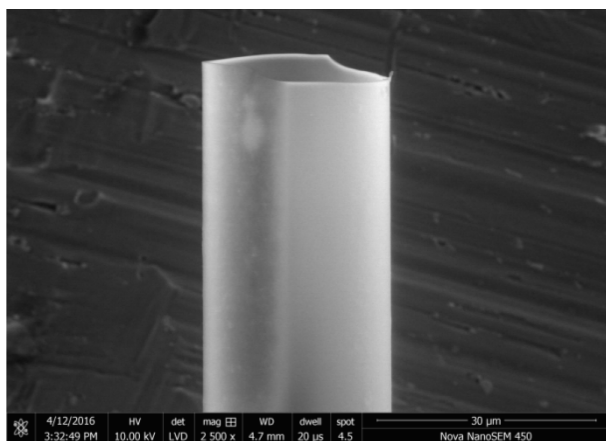
*Obr. 13(A) SEM snímek meniskem leptané špičky kapiláry a (B) SEM snímek mechanicky odstraněné špičky leptané kapiláry.*

Zužující se špička kapiláry by byla výhodná pro zvýšení účinnosti ionizace [123], nicméně stěna kapiláry u jejího ústí je natolik tenká, že při další manipulaci dochází velice snadno k jejímu lámání a výsledkem je opět nerovný profil konce kapiláry. V případě zlomení špičky může na konci kapiláry vzniknout hrot (Obr. 13 B), po kterém



vytéká elektrolyt z CE kapiláry. Komplikací v takovémto případě je také fakt, že lom špičky není okem viditelný a k jeho odhalení často dojde až v průběhu měření. Ke vzniku elektrospreje dochází až na špičce tohoto hrotu, a protože sprejovací napětí,  $U_{\text{spray}}$ , potřebné ke vzniku elektrospreje závisí na rozměrech sprejovací kapiláry (viz rovnice (2.12)), bude toto  $U_{\text{spray}}$  výrazně nižší. V případě měření v koncentrovanějších BGE o vyšší vodivosti (např. 25 mM octan amonný) pak ke vzniku ESI postačuje aplikace nízkého separačního napětí (do 4 kV, kapilára 40 cm) na HV 1 (Obr. 3), bez nutnosti vložení napětí na HV 2. V tomto uspořádání se v podstatě jedná o spojení kapilární elektroforézy s MS detekcí bez CE-MS rozhraní, jak popisuje Týčová a kol. [124]. Použití tohoto přístupu je ovšem značně omezené pro málo vodivé elektrolyty a dlouhé CE kapiláry. V koncentrovanějších BGE lze aplikovat pouze nízké HV 1, což vede ke snižování separační účinnosti, která je přímo úměrná separačnímu napětí (viz rovnice (2.10)). Navíc také není známo skutečné sprejovací napětí, tudíž ani to separační.

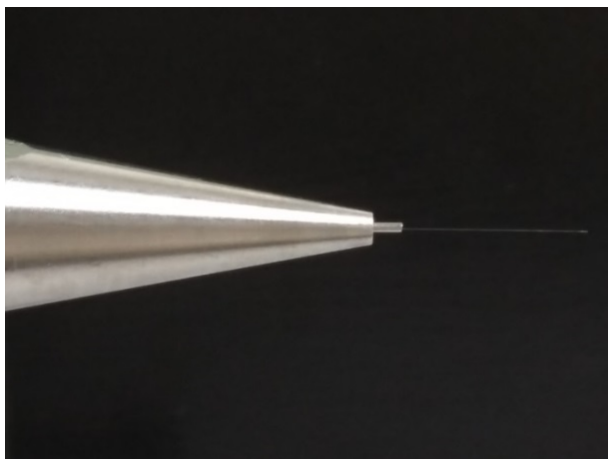
Z těchto důvodů je výhodnější zamezit vztlínání směsi po povrchu kapiláry a tvorbě velmi křehkého konce kapiláry. Tohoto bylo dosaženo leptáním na rozhraní dvou fází, kdy byla nad HF přidána vrstva lehké, netěkavé kapaliny (oktanol). Výsledkem byl relativně rovný profil konce kapiláry (Obr. 14).



*Obr. 14 SEM snímek konce kapiláry po odleptání špičky na rozhraní dvou fází (oktanol/48 % HF).*

Před prvním měřením je potřeba z povrchu kapiláry důkladně odstranit zbytky oktanolu oplachem sérií rozpouštědel: propan-2-ol, methanol/propan-2-ol (1/1 v/v), methanol-acetonitril (1/1 v/v), methanol.

Takto připravená kapilára se zasune do kovové ESI sprejovací kapiláry tak, že 1 cm leptané kapiláry přesahuje ven z kovové kapiláry (Obr. 15), a zbylý 1,5 cm leptané kapiláry je v kontaktu s vodivou kapalinou uvnitř ESI sprejovací kapiláry. Tato délka je dostačující, aby případné ionty z vodivé kapaliny neposkytovaly signál v MS spektru.



*Obr. 15 Kapilára s porézní špičkou v ESI sprejovací kapiláře.*

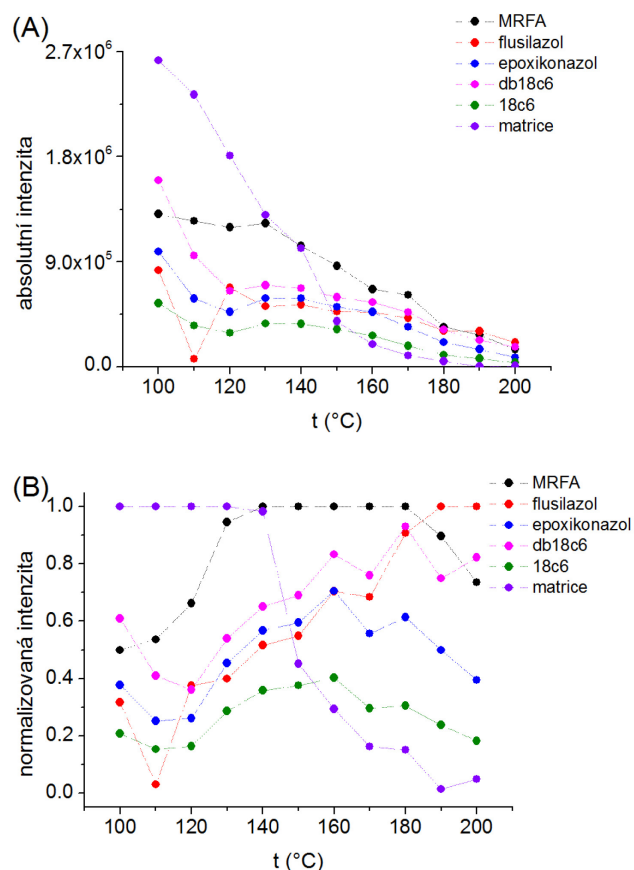
#### **4.1.2 Optimalizace sprejovacích podmínek pro rozhraní s porézní špičkou**

Podmínky pro vytvoření stabilního elektrospreje a získání spekter o dostatečné intenzitě se v upořádání pro CE-MS rozhraní s porézní špičkou značně liší od sprejovacích podmínek pro běžné ESI. Toto upořádání se svými rozměry i průtoky blíží spíše k nano-ESI.

Velikosti kapiček vznikajících sprejováním jsou výrazně menší než při běžném ESI, a tudíž není potřeba používat tak vysokých teplot vyhřívání kapiláry (kapilára sloužící pro převod a desolvataci iontů z prostředí o atmosférickém tlaku do vakua) jako pro ESI.

Závislosti absolutních a relativních intenzit píků vybraných analytů a MS standardu (peptid MRFA – Met-Arg-Phe-Ala) na teplotě vyhřívání kapiláry jsou na Obr. 16. Je vidět, že absolutní intenzita analytů klesá s rostoucí teplotou. Podstatnější ovšem je, že významně klesá intenzita píku, který neodpovídá žádnému z analytů. Pravděpodobně se

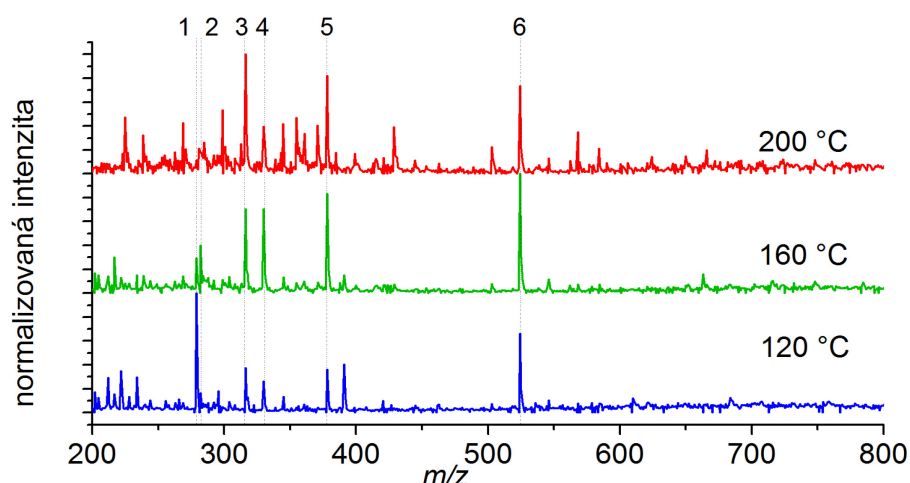
jedná o matriční iont. Při teplotách do 130 °C je tento pík ve spektru dominantní, avšak při teplotě nad 160 °C je již jeho intenzita nižší než intenzita nejméně abundantního analytu.



Obr. 16 Vztah mezi (A) absolutní a (B) normalizovanou intenzitou iontů analytů a teplotou vyhřívané kapiláry.

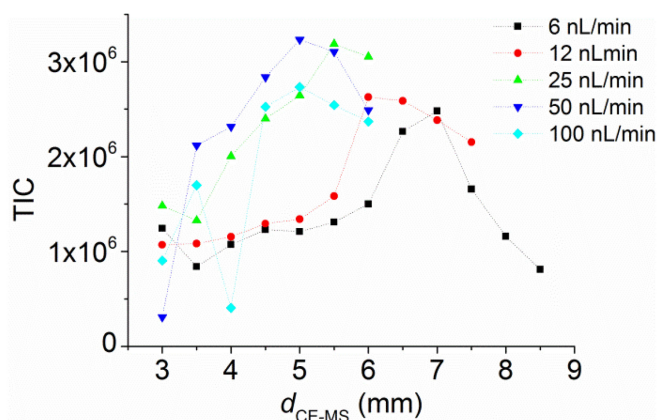
Jako optimální teplota pro toto CE-MS rozhraní byla zvolena teplota 160 °C. Při vyšších teplotách výrazně klesají intenzity signálů analytů (Obr. 16 A) a také klesá poměr signálu k šumu (S/N).

Normalizovaná hmotnostní spektra uvedené směsi analytů změřená při teplotách 120 °C, 160 °C a 200 °C jsou uvedena na Obr. 17.



Obr. 17 MS spektra směsi analytů o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  M při různých teplotách; 1 – matriční iont ( $m/z = 279$ ), 2 –  $18c6-NH_4^+$  ( $m/z = 282$ ), 3 –  $flusilazol+H^+$  ( $m/z = 316$ ), 4 –  $epoxikonazol+H^+$  ( $m/z = 330$ ), 5 –  $db-18-c-6+NH_4^+$  ( $m/z = 378$ ) a 6 –  $MRFA+H^+$  ( $m/z = 524$ ).

Dalšími důležitými parametry ovlivňujícími účinnost ionizace a stabilitu elektrospreje jsou vzdálenost ústí sprejovací kapiláry od vstupu do MS ( $d_{CE-MS}$ ), napětí vložené na sprejovací kapiláru ( $U_{spray}$ ) a průtok sprejovaného roztoku. Všechny tyto tři parametry spolu souvisí, avšak optimalizována je jen vzdálenost mezi ústím separační kapiláry a vstupem do MS. Optimalizace je omezena na tento jeden parametr protože (i) u CE separací rychlost EOF (průtok kapilárou) závisí na separačním napětí a (ii) sprejovací napětí je ovlivňováno separačním napětím a typem použitého rozpouštědla. Optimální  $d_{CE-MS}$  je taková, při níž je dostatečně vysoká intenzita signálu v širokém rozsahu průtoků BGE.



Obr. 18 Závislost velikosti signálu (total ion current, TIC) na vzdálenosti sprejovací špičky kapiláry od vstupu do MS,  $d_{CE-MS}$ .

Na Obr. 18 jsou znázorněny závislosti intenzity signálu (TIC) na  $d_{\text{CE-MS}}$  pro různé průtoky BGE separační kapilárou.

Kromě parametrů ovlivňujících účinnost ionizace byl také optimalizován průtok vodivé kapaliny kovovou sprejovací kapilárou (elektrodou pro HV 2). Příliš velký průtok vodivé kapaliny by způsobil její vytékání z kovové kapiláry a odkapávající kapičky by rozkmitávaly porézní špičku vystupující ven. Při nízkém průtoku hrozí odpaření vodivé kapaliny z kovové kapiláry a ztráta vodivého spojení mezi porézní špičkou a kovovou kapilárou. Jako vodivá kapaliny byl zvolen 5 % (v/v) roztok kyseliny octové ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O v poměru 1/1.

Vodivá kapalina je do ESI přiváděna 50 cm dlouhou křemennou kapilárou (50 x 180  $\mu\text{m}$  ID x OD). Zásobník vodivé kapaliny je uzemněn spolu s kostrou nesoucí CE sestavu. Průtok vodivé kapaliny byl regulován změnou tlaku aplikovaného na zásobník vodivé kapaliny. Pozorováním bylo zjištěno, že optimálního průtoku je dosaženo aplikací tlaku 30 mbar.

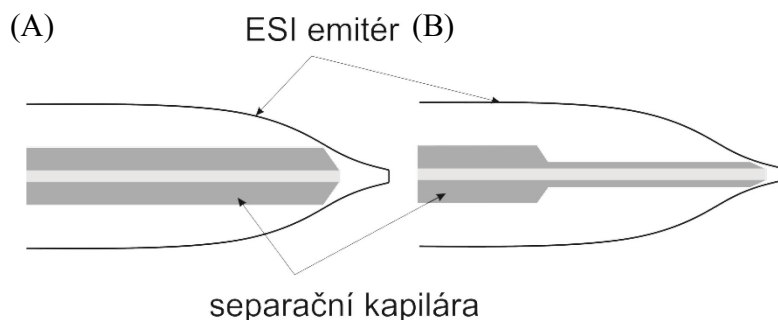
#### 4.1.3 Příprava rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny

Při přípravě rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny byly do značné míry využity poznatky získané při výrobě rozhraní s porézní špičkou. V tomto uspořádání je separační kapilára vložena do ESI emitéru, jehož konec se kónicky zužuje až do špičky o vnějším průměru  $\sim 35 \mu\text{m}$ . Aby došlo k co nejmenšímu ředění a rozmývání separovaných zón, je potřeba, aby se ústí separační kapiláry nacházelo co nejblíže k ústí ESI emitéru. Toho bylo dosaženo dvoustupňovým leptáním separační kapiláry.

V prvním stupni byla CE kapilára naleptaná tak, aby její vnější průměr byl co nejmenší a dosáhla tak co nejdál v zužující se špičce emitéru (Obr. 19), a zároveň aby stěna kapiláry ještě nevedla elektrický proud. Stěna křemenné kapiláry je elektricky vodivá, je-li tenčí než  $7 \mu\text{m}$ . Aby bylo zajištěno, že je stěna nevodivá, byl zvolen vnější průměr kapiláry  $55 \mu\text{m}$  (tloušťka stěny  $15 \mu\text{m}$ ). Ze závislosti vnějšího průměru CE kapiláry na době leptání (Obr. 10) byla určena potřebná doba leptání pro dosažení tohoto průměru (58,5 min).

Ve druhém kroku je špička kapiláry odleptána (v LS, 20 min) tak, že výsledná délka úseku o OD  $55 \mu\text{m}$  je 3 cm. Tato délka byla zvolena proto, aby byl dostatečný prostor

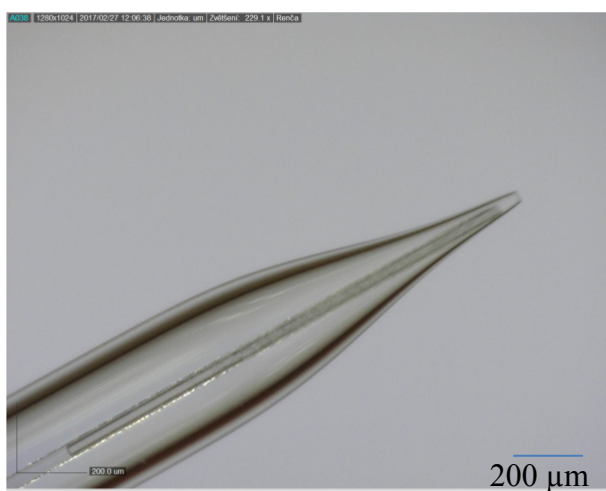
mezi vnější stěnou CE kapiláry a vnitřní stěnou emitéru a aby odpor kapaliny v tomto prostoru byl co nejmenší. Části kapiláry leptané v menisku LS získaly charakteristický kuželovitý tvar, což je výhodné, jelikož (i) nedochází ke skokové změně mezikruží mezi separační kapilárou a emitérem a (ii) zužující se špička dosáhne dál v emitéru (Obr. 19 B).



*Obr. 19 Schematické srovnání (A) jednostupňově a (B) dvoustupňově leptané separační kapiláry.*

Takto připravená CE kapilára je umístěna do ESI emitéru. Při sestavování rozhraní je důležité z povrchu kapiláry odstranit všechny prachové částice (např. oplachem kapiláry ve filtrované demi-vodě po celé její délce). V opačném případě dochází k zanesení a ucpání špičky emitéru a nestabilitě signálu.

Na Obr. 20 je snímek špičky emitéru s vloženou CE kapilárou získaný pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem.

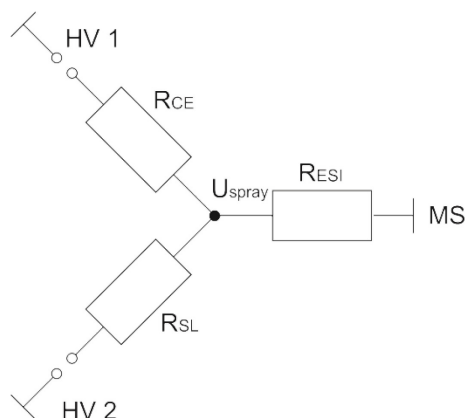


*Obr. 20 Snímek špičky emitéru s vloženou CE kapilárou.*

#### 4.1.4 Optimalizace sprejovacích podmínek pro rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny

Jako optimální vzdálenost mezi ústím emitéru a vstupem do MS,  $d_{\text{CE-MS}}$ , a teplota vyhřívané kapiláry, byly zvoleny tytéž hodnoty jako pro rozhraní s porézní špičkou.

Dalším optimalizovaným parametrem byl průtok pomocné kapaliny (*sheath liquid*, SL) emitérem. V původních Dovichiho pracích se uvádí, že pomocná kapalina je do emitéru přiváděna elektroosmoticky hnáným tokem [29] generovaným v borosilikátovém emitéru o  $pK_a \approx 3.5$  [125]. Směr tohoto toku ovšem závisí na odporech jednotlivých vodivých částí (Obr. 21), a proto nemusí být vždy ve směru ke špičce ESI emitéru.



Obr. 21 Schéma elektrického obvodu v CE-MS rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny.

Jelikož je elektrický odpor prostředí mezi špičkou ESI emitéru a hmotnostním spektrometrem,  $R_{\text{ESI}}$ , mnohonásobně větší než ostatní uvedené elektrické odpory, nebude elektrický proud tekoucí elektrosprejem v následujícím textu zohledněn. Při použití nepokryté křemenné separační kapiláry, křemenného ESI emitéru a normální polaritě separačního napětí, mohou nastat tyto tři situace:

- 1) EOF pomocné kapaliny teče ve směru ke špičce ESI emitéru. Toho je docíleno v případě, kdy je  $HV\ 2 > U_{\text{spray}}$ , tj., je-li elektrický odpor BGE v separační kapiláře,  $R_{\text{CE}}$ , dostatečně velký a zároveň je-li odpor pomocné kapaliny v ESI emitéru,  $R_{\text{SL}}$ , takový, aby došlo ke vzniku gradientu elektrického potenciálu a EOF v emitéru. V tomto případě velikost  $U_{\text{spray}}$  a závisí na velikosti napětí na HV 2 a odporu  $R_{\text{SL}}$ .

- 2) EOF čerpá pomocnou kapalinu z ESI emitéru směrem k zásobníku SL. K tomu dochází v případě, kdy je použit velmi vodivý BGE a elektrický odpor BGE v separační kapiláře,  $R_{CE}$ , je malý. V tomto okamžiku může nastat situace, kdy je  $HV\ 2 < U_{\text{spray}}$  a dochází k obrácení směru EOF v ESI emitéru. Velikost  $U_{\text{spray}}$  závisí na velikosti napětí na HV 1, HV 2 i na příslušných elektrických odporech a je velmi obtížné jej definovat.
- 3) V ESI emitéru nedochází ke vzniku EOF. V ideálním případě, kdy je  $R_{SL}$  velmi malý ( $R_{SL} \rightarrow 0$ ), není  $U_{\text{spray}}$  ovlivňováno napětím na HV 1 a je stejné jako napětí vložené na HV 2 ( $U_{\text{spray}} \approx HV\ 2$ ). Z důvodu absence gradientu elektrického potenciálu v ESI emitéru však nedochází ke vzniku EOF, který zajišťuje trvalý přísun SL do špičky ESI emitéru. Jelikož u tohoto rozhraní nejsou potřeba sušící plyny, neprojevuje se zde ani sací efekt [126], který by částečně kompenzoval absenci EOF v ESI emitéru.

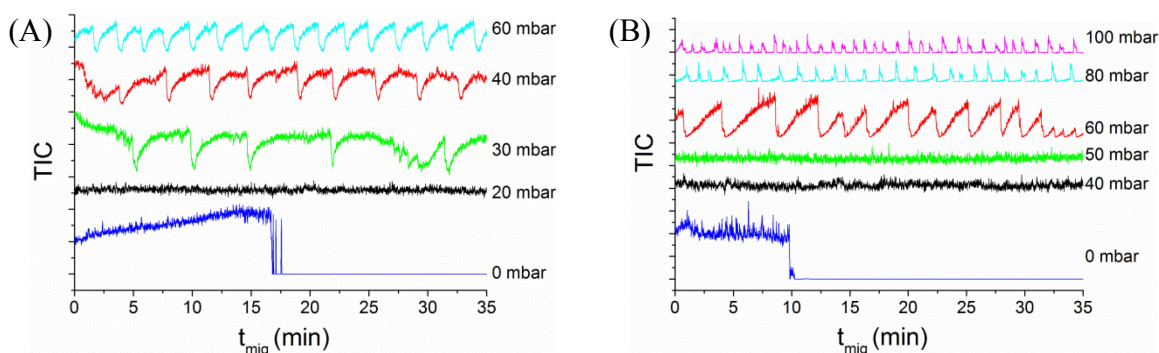
Odčerpáním pomocné kapaliny z ESI emitéru jak je uvedeno ve druhém případě, nebo spotřebováním SL ve špičce emitéru ve třetím případě, dojde v emitéru ke vzniku nevodivé vzduchové bubliny a k přerušení elektrického obvodu. V tomto okamžiku mohou - v závislosti na velikosti napětí na HV 1 a vodivosti BGE v separační kapiláře - nastat dvě situace: (i) ztrátou kontaktu s HV 2 zdrojem zajišťujícím sprejovací napětí dojde ke ztrátě signálu, nebo (ii) systém se začne chovat jako tzv. „*interface-free*“, jak je popsáno v práci Týčové a kol. [124]. Obě tyto situace jsou pro ACE-MS nežádoucí.

Pro zajištění stabilního vodivého spojení mezi BGE v separační kapiláře a HV 2 je zapotřebí kompenzovat/nahradit elektroosmotický tok v ESI emitéru. Toho lze docílit vložením nízkého tlaku na zásobník SL. Velikost potřebného tlaku je závislá na několika parametrech, z nichž nejvýznamnějšími jsou pH a viskozita pomocné kapaliny a průtok BGE separační kapilárou. Dále pak je to délka a vnitřní průměr kapiláry přivádějící SL do emitéru. pH pomocné kapaliny souvisí s pH elektrolytu použitého pro separaci a nepřímo tedy závisí na analytech. Viskozita SL závisí na organickém rozpouštědle (a jeho podílu v hydroorganické směsi, Obr. 1), které se přidává do SL pro zvýšení její těkavosti. Zbylé dva parametry jsou volitelné. Jelikož je však cílem, aby elektrický odpor kapiláry přivádějící pomocnou kapalinu byl co největší, je výhodné



použít dlouhou kapiláru o malém ID. Z praktických důvodů (snadný proplach a výměna SL) byla pro tyto účely použita 50 cm dlouhá křemenná kapilára o ID = 50  $\mu\text{m}$ .

Vliv průtoku pomocné kapaliny na stabilitu ESI signálu pro dvě různá pH pomocné kapaliny je znázorněn na Obr. 22. Je-li použita silně kyselá SL (pH = 3, Obr. 22 A), nedochází k výrazné disociaci -Si-OH skupin na vnitřní straně ESI emitéru. V tomto případě je elektroosmotický tok odčerpávající SL z ESI emitéru velmi pomalý a k jeho kompenzaci stačí nízký tlak (20 mbar) aplikovaný na zásobní vialku. V případě použití vyššího tlaku dochází k destabilizaci elektrospreje a kolísání celkového iontového proudu (TIC). Není-li na zásobní vialku aplikovaný žádný tlak, dochází v prvních minutách ke zvyšování TIC, jelikož s úbytkem SL dochází ke zvyšování účinnosti ionizace. Po určité době je však SL z ESI emitéru vyčerpaná a dojde k přerušení kontaktu mezi BGE a HV2. To má (v uvedeném případě) za následek ztrátu ESI signálu. Obdobné závislosti lze pozorovat i pro SL o vyšším pH (5,5, Obr. 22 B). Při tomto pH jsou však -Si-OH skupiny více disociovány a elektroosmotický tok čerpající SL z emitéru je výraznější. Pro jeho kompenzaci je tedy zapotřebí aplikovat na zásobní vialku SL vyšší tlak (50 mbar).



Obr. 22 Průběh celkového iontového proudu (Total Ion Current, TIC) v čase při různých průtocích pomocné kapaliny (SL); SL: octan amonný ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1), I = 10 mM, (A) pH = 3 a (B) pH = 5,5. HV1 = 17 kV, HV2 = 1,7 kV, délka kapiláry CE 60 cm, polyakrylamidový povlak vnitřního povrchu kapiláry, průtok BGE kapilárou 10 nL min<sup>-1</sup>.

## 4.2 EOF markery pro ACE-MS

Stanovení konstant stability komplexů neutrálních ligandů s ionty kovů pomocí ACE je založeno na měření závislostí elektivních elektroforetických pohyblivostí ligandů,

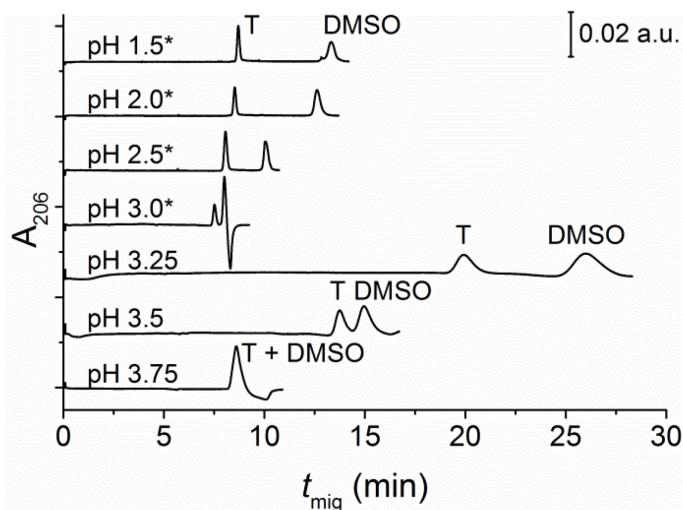
$\mu_{L,ef}$ , na koncentraci iontů kovů v BGE (viz kapitola 2.3.1). Pro výpočet  $\mu_{L,ef}$  je nezbytná znalost migračních časů ligandů a markerů EOF (rovnice (2.7)). Jak je uvedeno v kapitole 2.1.3, pro *online* CE-MS nelze použít běžných EOF markerů a je potřeba najít vhodnější alternativu.

Z předběžných experimentů bylo zjištěno, že triazolové fungicidy (tebukonazol, penkonazol, epoxikonazol, flusilazol a cyprokonazol) jen velmi slabě interagují s alkalickými kovy a to i v organických rozpouštědlech. Tyto látky jsou relativně dobře ionizovatelné v ESI a jejich  $M_r > 280$ . Navíc se jedná o deriváty 1,2,4-triazolu, který je slabou bází s  $pK_a = 2,39$  [127]. Za předpokladu, že by  $pK_a$  těchto látek byla shodná nebo nižší než  $pK_a$  1,2,4-triazolu, jednalo by se o látky vhodné pro použití jako EOF markery pro stanovení konstant stability komplexů při  $pH = 5,5$ . Při tomto  $pH$  je protonizováno méně než 0,1% slabé báze s  $pK_a < 2$ .

Pro ověření vhodnosti triazolových fungicidů jako EOF markerů pro ACE-MS experimenty byly stanoveny hodnoty jejich  $pK_a$ , a byla sledována jejich afinita k alkalickým kovům ( $Li^+$ ,  $K^+$ ).

#### 4.2.1 Stanovení $pK_a$ triazolových fungicidů - publikace III

Stanovení  $pK_a$  vybraných triazolových fungicidů bylo provedeno metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) v rozsahu  $pH$  od 1,17 do 4,50. S klesajícím  $pH$  se snižoval stupeň disociace Si-OH skupin na povrchu křemenné kapiláry, a tudíž klesala i elektroosmotická pohyblivost nosného elektrolytu (BGE). Z tohoto důvodu byl během měření v BGE o  $pH < 3,25$  na vstupní straně kapiláry aplikován nízký tlak (8 mbar), který urychlil tok BGE kapilárou a výrazně tak zkrátil dobu analýzy. Na Obr. 23 jsou uvedeny některé elektroforegramy z měření  $pK_a$  fungicidu tebukonazolu (pík T) za použití DMSO jako markeru EOF. Měření prováděná za použití tlaku jsou označena hvězdičkou.



Obr. 23 CZE elektroforegramy pro stanovení  $pK_a$  tebukonazolu, T, s DMSO jako markerem elektroosmotického toku. Hvězdička označuje měření prováděná za použití tlaku.

Ze změřených migračních časů fungicidů a EOF markeru byly vypočítány efektivní elektroforetické pohyblivosti fungicidů (slabých bází, rovnice (2.7)). Vzhledem k tomu, že měření byla prováděna na zařízení bez efektivního chlazení separační kapiláry, byly změřené pohyblivosti,  $\mu_{ef,T}$ , přepočteny na pohyblivosti při teplotě 25 °C,  $\mu_{ef,25}$ , podle rovnice:

$$\mu_{ef,25} = \mu_{ef,T} \left[ 1 - \Delta\eta_{rel} (T_0 + \Delta T - 25) \right] \quad (4.2)$$

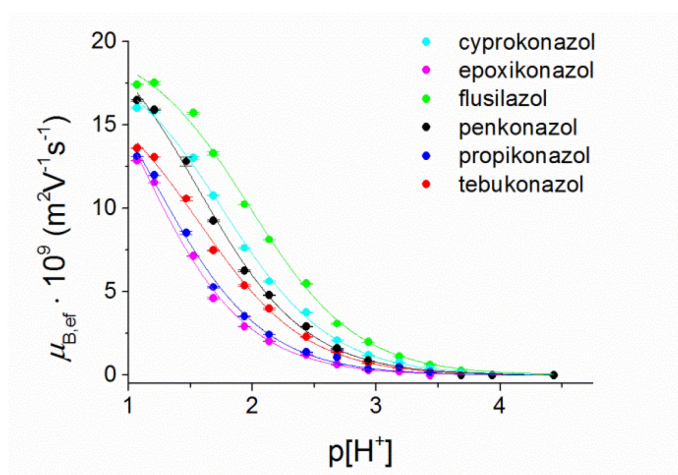
kde  $\Delta\eta$  je relativní změna viskozity na 1 °C,  $T_0$  je okolní teplota a  $\Delta T$  je změna teploty v kapiláře vlivem ohřevu Jouleovým teplem [12].

Použití BGE o velmi nízkých pH neumožnilo udržení konstantní iontové síly,  $I$ , ve všech použitých BGE a iontová síla BGE byla vyšší v elektrolytech o  $pH < 1,54$ . Z tohoto důvodu byly změřené aktuální efektivní elektroforetické pohyblivosti přepočteny na efektivní elektroforetické pohyblivosti při iontové síle BGE  $I = 25$  mM. Ke korekci byla použita teorie dle Falkenhagena [44] a Pittse [45] (rovnice (2.4)). Proměnlivost  $I$  nosného elektrolytu vedla k tomu, že funkce běžně používaná pro výpočet  $pK_a$  musela být upravena tak, aby bylo možné do ní zahrnout vliv iontové síly elektrolytu. Výsledná funkce pro stanovení  $pK_a$  z elektroforetických měření při proměnlivé iontové síle BGE je závislostí efektivní pohyblivosti slabé báze ( $\mu_{B,ef}$ ) na záporném logaritmu rovnovážné koncentrace  $H^+$ ,  $p[H^+]$  (rovnice (4.3)):

$$\mu_{B,ef} = \mu_{BH^+} \frac{1}{1 + 10^{p[H^+] - pK_a}} \quad (4.3)$$

kde  $\mu_{BH^+}$  je iontová pohyblivost protonizované slabé báze B.

Navzdory tvrzení některých autorů, že triazolové fungicidy tebukonazol a penkonazol jsou ve vodných roztocích protonizovány již při  $pH < 6$  ( $pK_a = 5$ , respektive 5,2) [128], CZE experimenty ukázaly, že k protonizaci těchto látek dochází v roztocích o  $pH$  výrazně nižším. První známky protonizace – separace zóny fungicidu flusilazolu od zóny neutrálního EOF markeru - byly pozorovány v BGE o  $pH = 3,75$ . S klesající hodnotou  $pH$  elektrolytu stoupal stupeň protonizace fungicidů a tím rostla jejich efektivní elektroforetická pohyblivost. Závislosti efektivních pohyblivostí na  $p[H^+]$  jsou znázorněny na Obr. 24.



Obr. 24 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí slabých bází po teplotní korekci a korekci na konstantní iontovou sílu, na  $p[H^+]$ .

Nelineární regresní analýzou experimentálních dat po jejich korekci na konstantní teplotu a iontovou sílu BGE byly získány hodnoty  $pK_a$  triazolových fungicidů. Ve všech studovaných případech byla naměřena nižší hodnota  $pK_a$   $^1N$  substituovaného dusíku 1,2,4-triazolu, než samotného nesubstituovaného 1,2,4-triazolu. Nejnížší stanovenou hodnotu  $pK_a$  má fungicid epoxikonazol, nejvyšší pak flusilazol.

Tab. 2 Hodnoty  $pK_a$  triazolových fungicidů stanovené při 25 °C metodou kapilární zónové elektroforézy, spočítané pomocí komerčního kalkulátoru a uvedené v literatuře.

Triazolové fungicidy	$pK_a \pm SD$	$pK_{a,calc}$ SPARC	Literatura	
			$pK_a$	Reference
Cyprokonazol	$1.76 \pm 0.01$	1.16	2.3	[129]
Epoxikonazol	$1.05 \pm 0.03$	0.97	n.f.	
Flusilazol	$1.97 \pm 0.01$	1.26	2.5	[129, 130]
Penkonazol	$1.57 \pm 0.02$	1.39	$5.2 \pm 0.1$ , 2.83	[128],[131]
Propikonazol	$1.21 \pm 0.03$	0.91	3.06, 1.09, 1.10	[132], [133], [129]
Tebukonazol	$1.57 \pm 0.01$	1.56	$5.0 \pm 0.1$ , 3.39	[128], [132]
1,2,4-Triazol	n.d.	2.09	2.39	[127]

n.d. - nestanovené, n.f. – nenalezeno

Pro srovnání naměřených hodnot aciditních konstant s teoreticky spočítanými hodnotami byl využit SPARC *online* kalkulátor [130], umožňující orientační výpočty některých fyzikálně-chemických parametrů na základě struktury látek [134]. Naměřené hodnoty  $pK_a$  a hodnoty vypočtené pomocí SPARC kalkulátoru jsou uvedeny v Tab. 2.

Z Tab. 2 je zřejmé, že hodnoty  $pK_a$  naměřené pomocí ACE se relativně dobře shodují s hodnotami vypočtenými pomocí SPARC. Na druhou stranu některé hodnoty z dříve publikovaných prací [128] se od námi stanovených významně liší.

Hodnoty aciditních konstant studovaných fungicidů jsou nižší než 2, proto jsou tyto látky vhodné k dalšímu testování pro použití jako EOF markery pro afinitní měření v BGE o pH 5,5.

#### 4.2.2 Afinita triazolových fungicidů k alkalickým kovům

Interakcemi triazolových fungicidů (TF) s kationty kovů se zabývají některé naše dříve publikované práce (např. publikace II) [135-139]. V těchto pracích byly studovány síly interakcí triazolových fungicidů s některými dvojmocnými kovy metodou kolizně indukované disociace v MS (CID/MS). Doplnujícími DFT (*density functional theory*) výpočty bylo zjištěno, že k tvorbě vazby mezi kationtem a fungicidem dochází primárně na  $^2N$  triazolového kruhu. Studované TF vytvářejí poměrně silné vazby s d-prvky druhé a třetí periody, což jsou měkké Lewisovy kyseliny. Platí-li Pearsonovo pravidlo, že

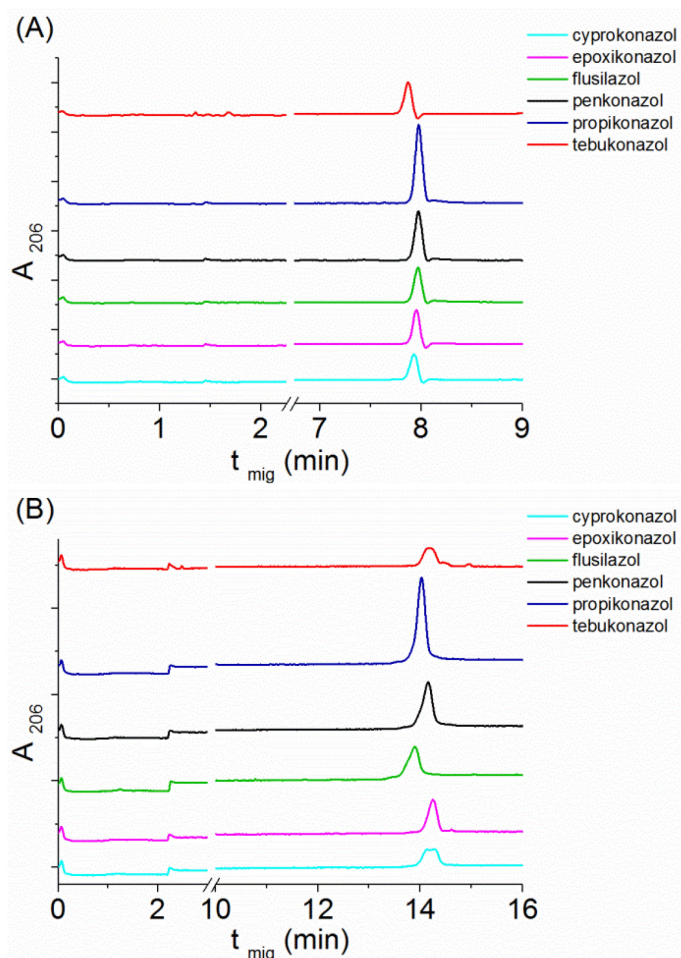
stabilní komplexy vznikají při interakci tvrdé (měkké) báze s tvrdou (měkkou) kyselinou, lze usuzovat, že TF jsou měkkou Lewisovou bází. Oproti tomu alkalické kovy patří mezi tvrdé Lewisovy kyseliny, a tudíž lze předpokládat, že interakce mezi TF a alkalickými kovy budou velmi slabé.

Pro ověření předpokladu velmi slabé interakce mezi TF a alkalickými kovy byla provedena afinitní měření. Do BGE tvořeného 25 mM TRIS/AcO<sup>-</sup> o pH 5,5 byl přidáván KCl a LiCl a byla sledována změna pohyblivosti zóny TF. První známky interakce mezi TF a K<sup>+</sup> byly pozorovány v BGE obsahujícím 50 mM KCl, interakce TF s Li<sup>+</sup> pozorována nebyla.

Aby byly TF vhodné pro použití jako EOF markery pro ACE-MS, musí být jejich efektivní elektroforetická pohyblivost za experimentálních podmínek nulová, tj., nesmí docházet k separaci zón TF od zóny EOF markeru.

Na Obr. 25A jsou elektroforegramy separace TF od DMSO (EOF marker) v 25 mM TRIS/AcO<sup>-</sup> BGE o pH 5,5. V BGE je také 25 mM KCl, což je nejvyšší koncentrace, která byla použita pro následující ACE-MS experimenty. Za těchto podmínek je pozorován jediný symetrický pík odpovídající zóně obsahující EOF marker spolu s TF, tzn., že pohyblivost TF je nulová.





Obr. 25 ACE elektroforegramy sledování interakce mezi triazolovými fungicidy a  $K^+$  ionty. Složení BGE 25 mM TRIS, 28,8 mM AcOH s přidavkem (A) 25 mM KCl a (B) 50 mM KCl. TF o koncentraci 0,1 mM je spolu s 0,01 % DMSO dávkován do kapiláry tlakem 10 mbar po dobu 5 s.

Změna pohyblivosti TF v BGE obsahujícím 50 mM KCl, která je důsledkem interakce TF s  $K^+$  ionty, je vidět na obrázku Obr. 25B. Separace TF od DMSO je zřejmá v případě cyprokonazolu a tebukonazolu. Na základě těchto měření nelze říci, že interakce těchto TF s  $K^+$  jsou silnější než s ostatními, protože změna efektivní pohyblivosti souvisí nejen se stabilitou vznikajících komplexů, ale též s jejich iontovou pohyblivostí. Pozorované interakce jsou natolik slabé, že žádnou z metod ACE nelze s dostatečnou přesností stanovit konstantu stability vznikajících komplexů.

Tato pozorování jsou však dostačující pro to, aby bylo možno posoudit vhodnost použití TF jako EOF markerů. Přítomnost 50 mM  $K^+$  v BGE nejméně (téměř

zanedbatelně) ovlivňuje pohyblivost epoxikonazolu, propikonazolu a penkonazolu. Z těchto tří kandidátů byl jako EOF marker vybrán propikonazol, jehož  $pK_a$  je 1,21, a tudíž bude při pH 5,5 protonizován méně než z 0,05 %.

### 4.3 Stanovení konstant stability komplexů

Vhodnost a vlastnosti CE-MS rozhraní pro stanovení konstant stability komplexů,  $K_{st}$ , byla testována na dobře definovaných komplexech crown etherů (dibenzo-18-crown-6, benzo-18-crown-6 a 18-crown-6) s draselnými kationty. Stanovení  $K_{st}$  bylo prováděno metodou afinitní kapilární elektroforézy s UV (ACE-UV) i MS (ACE-ESI/MS) detekcí.

#### 4.3.1 ACE-UV

V první fázi byl pomocí ACE-UV vybrán vhodný elektrolytový systém. Základním požadavkem byla zanedbatelná nebo minimální interakce crown etherů (dále ligandy) se složkami BGE. Z hlediska ACE-UV lze volit mezi širokou škálou elektrolytů. Situace je komplikovanější v případě ACE-MS, kdy je ideální použití těkavých elektrolytů jako jsou kyselina mravenčí, octová a jejich amonné soli, apod. Nevhodné jsou pak např. kvartérní amoniové soli [140], které mohou „sedět“ v hmotnostním spektrometru i několik měsíců jako kontaminanty na pozadí.

Elektrolyty vhodné pro stanovení  $K_{st}$  byly testovány ve směsi methanol/voda v poměru 1/1. V tomto rozpouštědle byly pozorovány interakce ligandů s  $NH_4^+$ , který byl tímto vyloučen jako kation vhodný pro využití jako složka BGE. Z testovaných kationtů nebyla při 25 °C pozorovaná interakce ligandů s  $Li^+$ .

Jelikož je jedním z cílů práce studium vlivu rozpouštědla na konstantu stability komplexu, dalším požadavkem byla možnost udržení stejného pH (5,5) elektrolytu v hydro-organických směsích s různými poměry organické fáze. Pro tyto účely je vhodná AcOH, jejíž  $pK_a$  je definováno pro různá rozpouštědla a jejich hydro-organické směsi. Pro ACE-UV i ACE-MS byl jako BGE použit octan lithný.

Aby bylo možno posuzovat vhodnost CE-MS rozhraní pro stanovení  $K_{st}$  komplexů, bylo potřeba získat referenční hodnoty  $K_{st}$ . Ty byly získány měřením  $K_{st}$  studovaných

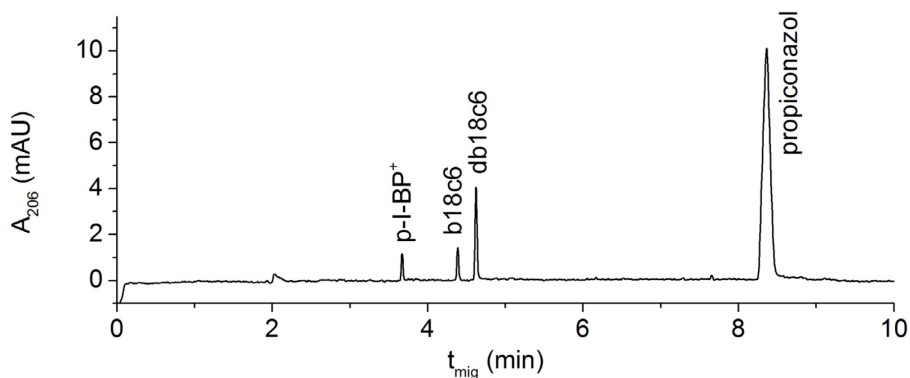


komplexů metodou ACE-UV za stejných podmínek jako plánované ACE-MS experimenty ( $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $I = 10\text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 5,5$ ).

Do nepokryté křemenné kapiláry byla dávkována směs dibenzo-18-crown-6 (db18c6), benzo-18-crown-6 (b18c6) a 18-crown-6 (18c6) etheru o koncentracích  $2 \cdot 10^{-5}\text{ M}$  a markeru EOF (propikonazol, viz kapitola 4.2) o koncentraci  $10^{-4}\text{ M}$  tak, aby nadávkovaný objem tvořil 0,5 % celkového objemu kapiláry o délce 34 cm.

Směs analytů dávkovaná do separační kapiláry obsahovala také *p*-I-benzylpyridiniový kationt ( $10^{-4}\text{ M}$ ), který byl v ACE-MS použit jako mobilitní marker, jehož pohyblivost byla brána jako referenční hodnota pro další výpočty.

Z crown etherů dávkovaných do CE kapiláry, byly v UV při 206 nm detekovány pouze db18c6 a b18c6 (Obr. 26), které mají ve struktuře 1 – 2 benzenová jádra a absorbují UV záření (Obr. 26).



Obr. 26 Elektroforegram separace směsi crown etherů, mobilitního markeru *p*-I-benzylpyridiniového kationtu a markeru elektroosmotického toku, propikonazolu, v BGE obsahujícím 4 mM KCl.

Stanovené zdánlivé konstanty stability komplexů těchto crown etherů s  $\text{K}^+$ ,  $K_{\text{KL}}$ , a jejich elektroforetické pohyblivosti,  $\mu_{\text{KL}}$ , jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3 Zdánlivé konstanty stability komplexů crown etherů s  $K^+$  iontem ( $K_{KL}$ ) a jejich iontové pohyblivosti ( $\mu_{KL}$ ) stanovené při 20 °C metodou ACE-UV v hydro-organické směsi methanol/voda v poměru 3/2 (v/v) v BGE o  $I = 10$  mM.

ligand	$K_{KL} \pm SD$ $L \text{ mol}^{-1}$	$(\mu_{KL} \pm SD) \cdot 10^9$ $m^2 s^{-1} V^{-1}$
<b>18c6</b>	-	-
<b>b18c6</b>	$1647 \pm 27$	$13.0 \pm 0.2$
<b>db18c6</b>	$1297 \pm 17$	$12.0 \pm 0.1$

#### **Studium vlivu rozpouštědla na konstantu stability komplexu – publikace IV**

ACE s UV detekcí při 206 nm byla použita ke studiu vlivu rozpouštědla na konstantu stability komplexu dibenzo-18-crown-6 etheru s draselným kationtem.

Konstanty stability tohoto komplexu byly stanoveny v BGE obsahujícím octan lithný o pH = 5,5 a  $I = 25$  mM ve směsných, hydro-organických rozpouštědlech. Použitá rozpouštědla byla methanol, ethanol, propan-2-ol a acetonitril. Podíl organických rozpouštědel ve směsích byl v rozmezí 0 - 100 % (v/v).

Měření byla prováděna při teplotě 25 °C na zařízení s aktivním chlazením kazety se separační kapilárou i karuselu. Aby bylo dosaženo konstantní teploty během měření, bylo separační napětí nastavováno tak, aby byl příkon vždy nižší než  $0,4 \text{ W m}^{-1}$ .

Konstanty stability komplexu byly stanoveny nelineární regresní analýzou závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí ligandů na koncentraci  $K^+$  v BGE (viz kapitola 2.3). Efektivní elektroforetické pohyblivosti získané z elektroforetických dat (rovnice (2.7)) při různých koncentracích  $K^+$  (a tudíž různých  $I$ ) byly přepočteny na konstantní iontovou sílu pomocí rovnice (2.4) (podrobněji viz publikace IV).

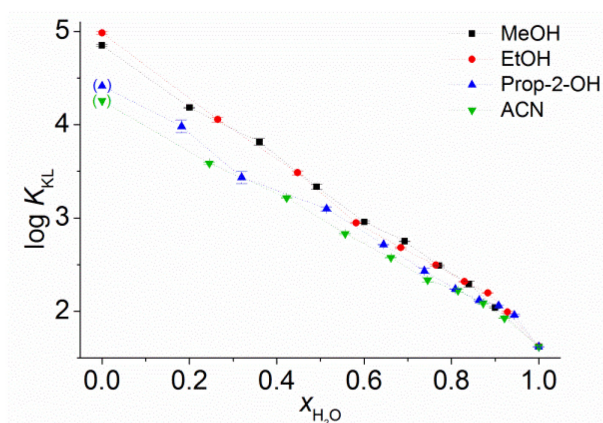
Zdánlivé konstanty stability komplexu db18c6 s  $K^+$  stanovené ve směsných hydro-organických (methanol/voda, ethanol/voda, propan-2-ol/voda a acetonitril/voda) rozpouštědlech jsou souhrnně uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Zdánlivé konstanty stability komplexu db18c6 s  $K^+$  iontem ( $K_{KL}$ ) stanovené při 25 °C ve směsných hydro-organických rozpouštědlech s různými podíly organických rozpouštědel.

Org. rozpouštědlo vol. %	$K_{KL} \pm SD \text{ (L mol}^{-1}\text{)}$			
	MeOH/voda	EtOH/voda	Pr2OH/voda	ACN/voda
<b>0</b>	$41.9 \pm 0.1$	$41.9 \pm 0.1$	$41.9 \pm 0.1$	$41.9 \pm 0.1$
<b>20</b>	$110 \pm 1$	$98.7 \pm 1.2$	$91.2 \pm 0.9$	$84.7 \pm 0.4$
<b>30</b>	$196 \pm 8$	$157 \pm 1$	$116 \pm 0$	$122 \pm 1$
<b>40</b>	$309 \pm 3$	$208 \pm 1$	$131 \pm 1$	$167 \pm 2$
<b>50</b>	$564 \pm 2$	$313 \pm 3$	$173 \pm 0$	$217 \pm 6$
<b>60</b>	$907 \pm 12$	$481 \pm 6$	$271 \pm 8$	$376 \pm 1$
<b>70</b>	$2160 \pm 70$	$887 \pm 3$	$521 \pm 3$	$677 \pm 6$
<b>80</b>	$6500 \pm 290$	$3050 \pm 70$	$1260 \pm 30$	$1650 \pm 1$
<b>90</b>	$15300 \pm 100$	$11300 \pm 300$	$2750 \pm 190$	$3880 \pm 20$
<b>95</b>			$9600 \pm 750$	
<b>100</b>	$70600 \pm 800$	$96300 \pm 1800$	$26000 \pm 1100^*$	$18000 \pm 900^*$

\* označuje hodnoty získané lineární extrapolací naměřených dat

Z Tab. 4 lze vyčíst, že konstanta stability komplexu db18c6 s  $K^+$  roste s rostoucím podílem organického rozpouštědla ve směsi. Tento růst je nejvýraznější v případě směsí methanol/voda a ethanol/voda. Po vynesení závislosti  $\log K_{KL}$  na molárním zlomku vody v hydro-organické směsi (Obr. 27) lze pozorovat podobný vliv methanolu a ethanolu na konstantu stability komplexu.



Obr. 27 Závislost logaritmu konstanty stability komplexu  $db18c6-K^+$ ,  $\log K_{KL}$ , na molárním zlomku vody v hydro-organických směsných rozpouštědlech.

Závislost  $\log K_{KL}$  na  $x_{H_2O}$  je navíc přibližně lineární, což umožňuje extrapolaci dat a získání konstanty stability komplexu v rozpouštědlech, ve kterých je tato hodnota z důvodů omezené rozpustnosti iontů solí experimentálně těžko dosažitelná (propan-2-ol, acetonitril).

Podrobnější informace jsou popsány v publikaci IV.

#### 4.3.2 ACE-ESI/MS - publikace V

Pro stanovení konstanty stability komplexů crown etherů s  $K^+$  iontem metodou ACE-ESI/MS byla testována výše popsaná CE-ESI/MS rozhraní. Testovaná byla citlivost a robustnost rozhraní a vhodnost rozhraní pro stanovení  $K_{KL}$ . Měření s oběma rozhraními byla provedena ve stejných BGE i směsích analytů.

Komplikací při stanovení  $K_{KL}$  metodou ACE-ESI/MS s rozhraními s porézní špičkou a s nano-tokem pomocné kapaliny je nemožnost přímého výpočtu efektivní elektroforetické pohyblivosti. To je způsobeno tím, že v případě těchto CE-ESI/MS rozhraní není skutečné separační napětí dané rozdílem mezi napětími vloženými zdroji HV 1 a HV 2, ale rozdílem mezi napětím vloženým na HV 1 a  $U_{\text{spray}}$ . V případě, že v CE-ESI/MS rozhraní není efektivně odděleno sprejovací napětí od napětí vloženého zdrojem HV 1, bude hodnota  $U_{\text{spray}}$  ovlivňována také velikostí HV 1.

### ***Stanovení efektivní pohyblivosti z CE-ESI/MS dat***

Pro výpočet efektivní elektroforetické pohyblivosti ligandu,  $\mu_{L,ef}$ , je zapotřebí znát aktuální separační napětí,  $U_{sep}$ . Toto nelze získat přímým odečtem z vysokonapětových zdrojů, a proto byla aplikovaná nepřímá metoda stanovení  $U_{sep}$ . K tomu byl použit tzv. mobilitní marker neboli látka, jejíž efektivní elektroforetická pohyblivost,  $\mu_{MM,ef}$ , je za daných experimentálních podmínek známá.

Jako mobilitní marker byl použit p-I-benzylpyridinium chlorid a jeho  $\mu_{MM,ef}$  byla změřena pomocí CE-UV v BGE obsahujících celý rozsah použitých koncentrací KCl.

Mobilitní marker byl dávkován do separační kapiláry jako součást směsi analytů.

Z migračních časů mobilitního markeru ( $t_{mig,MM}$ ) a markeru EOF ( $t_{EOF}$ ), celkové délky separační kapiláry ( $l_{tot}$ ) a lze vypočítat aktuální  $U_{sep}$  pomocí rovnice (4.4).

$$U_{sep} = \frac{l_{tot}^2}{\mu_{MM,ef}} \left( \frac{1}{t_{mig,MM}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (4.4)$$

Kombinací rovnic (2.7) a (4.4) lze získat vztah, umožňující výpočet  $\mu_{L,ef}$  z migračních časů ligandů, mobilitního a EOF markeru a  $\mu_{MM,ef}$  (rovnice (4.5)).

$$\mu_{L,ef} = \mu_{MM,ef} \frac{t_{mig,MM}}{t_{mig,L}} \frac{t_{EOF} - t_{mig,L}}{t_{EOF} - t_{mig,MM}} \quad (4.5)$$

### ***Robustnost CE-ESI/MS rozhraní***

Robustnost CE-ESI/MS rozhraní je vyjádřena jeho schopností udržet stejné sprejovací napětí při změně experimentálních podmínek. Experimentálními podmínkami jsou v tomto smyslu myšleny zejména vodivost a složení BGE.

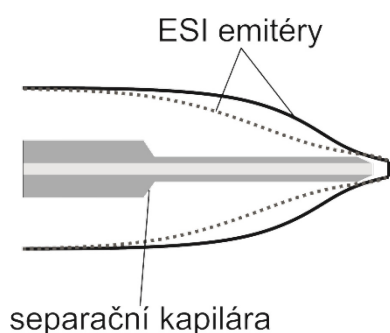
Robustnost obou sestavených CE-ESI/MS rozhraní byla testována s využitím mobilitních markerů, pomocí kterých byly vypočteny hodnoty  $U_{spray}$  pro všechny použité koncentrace KCl v BGE (tzn. vodivosti BGE).

#### ***Rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny***

V případě rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny je napětí na špičce ESI emitéru přiváděno z HV 2 prostřednictvím vodivé kapaliny, která vyplňuje celý objem mezi separační kapilárou v ESI emitéru a jeho stěnou a je v přímém kontaktu s platinovou elektrodou. Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1.4, velikost aktuálního sprejovacího

napětí závisí na elektrických odporech jednotlivých úseků elektrického obvodu (viz Obr. 21).

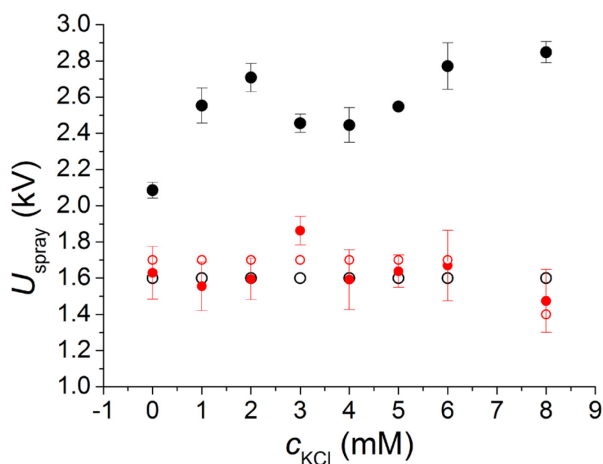
Elektrický odpor  $R_{CE}$  je dán složením BGE a rozměry separační kapiláry a velikost elektrického odporu  $R_{SL}$  závisí na složení pomocné kapaliny a rozměrech a též i tvaru ESI emitéru. Na Obr. 28 jsou uvedeny dva typy ESI emitérů: (i) emitér s prudkým zúžením špičky a (ii) emitér s pozvolným zúžením špičky. Oba typy emitéru byly vyrobeny tažením křemenných trubiček o rozměrech 0,3 x 0,4 mm (ID x OD) v plameni. Výsledný tvar špičky záleží na šířce plamene, ve kterém probíhá tažení a obvykle platí, že v širším plameni vznikají protaženější špičky.



Obr. 28 Ilustrační nákres možných tvarů ESI emitérů - emitér s prudkým zúžením špičky a s pozvolným zúžením špičky.

S využitím mobilního a EOF markeru byl sledován vliv tvaru emitéru na aktuální sprejovací napětí při různých vodivostech (koncentracích KCl) BGE v separační kapiláře. Vliv tvaru ESI emitéru je znázorněn na Obr. 29, kde jsou vyneseny získané hodnoty  $U_{\text{spray}}$  v závislosti na koncentraci KCl v BGE. V případě emitéru s pozvolným zúžením špičky (černě) je vidět zvyšování měřené hodnoty  $U_{\text{spray}}$  (plné body) s rostoucí koncentrací KCl v BGE, ačkoliv hodnota vloženého  $U_{\text{spray}}$  (prázdné body) byla konstantní. Z uvedeného je zřejmé, že efektivního oddělení  $U_{\text{spray}}$  od napětí vloženého na HV 1 bylo dosaženo v případě, kdy byl použit ESI emitér s prudkým zúžením špičky (červeně), jelikož v tomto případě se změřené a vložené hodnoty  $U_{\text{spray}}$  příliš neliší. (Rozdíl mezi průměrnou hodnotou změřeného  $U_{\text{spray}}$  a vloženou hodnotou je cca 100 V, což lze přičíst nepřesnostem zobrazovačů na HV 1 a 2). Efektivního oddělení  $U_{\text{spray}}$  od HV 1 v případě ESI emitéru s prudkým zúžením špičky bylo docíleno redukcí oblasti

s velkým elektrickým odporem, což je oblast mezi koncem separační kapiláry a špičkou emitéru.

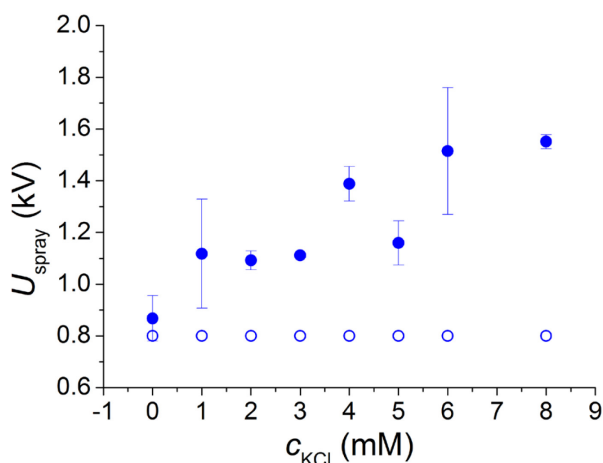


Obr. 29 Aktuální velikosti (plné body) a velikosti vloženého (prázdné body) separačního napětí v závislosti na vodivosti elektrolytu (koncentraci KCl) pro rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny. Červeně – ESI emitér s prudkým zúžením špičky a černě – ESI emitér s emitér pozvolným zúžením špičky.

#### *Rozhraní s porézní špičkou*

Schopnost oddělení sprejovacího napětí od napětí vloženého na HV 1 byla testována též pro rozhraní s porézní špičkou.

Velikosti aktuálního sprejovacího napětí při různých koncentracích KCl v BGE (vodivosti BGE) jsou vyneseny na Obr. 30. Zde je patrné, že u tohoto rozhraní není  $U_{\text{spray}}$  efektivně odděleno od elektrického napětí vloženého na HV 1, a že aktuální  $U_{\text{spray}}$  roste s rostoucí vodivostí BGE.



Obr. 30 Aktuální velikosti (plné body) a velikosti vloženého (prázdné body) separačního napětí v závislosti na vodivosti elektrolytu (koncentraci KCl) pro rozhraní s porézní špičkou.

Ovlivňování  $U_{\text{spray}}$  elektrickým napětím vloženým na HV 1 pravděpodobně souvisí s elektrickým odporem mezi BGE a elektrodou, na níž je vloženo napětí z HV 2. V tomto uspořádání je však porézní stěna separační kapiláry v těsné blízkosti ( $< 200 \mu\text{m}$ ) elektrody (kovové kapiláry), na kterou je vloženo HV 2 a napětí je k ní přivedeno vodivým elektrolytem (5 % AcOH ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O, 1/1). A jelikož je elektrický odpor prostředí mezi porézní špičkou kapiláry a elektrodou nesoucí HV 2 minimální, musí být elektricky málo vodivá právě porézní špička kapiláry, jejíž tloušťka je 3 – 4  $\mu\text{m}$ .

### Citlivost CE-ESI/MS rozhraní

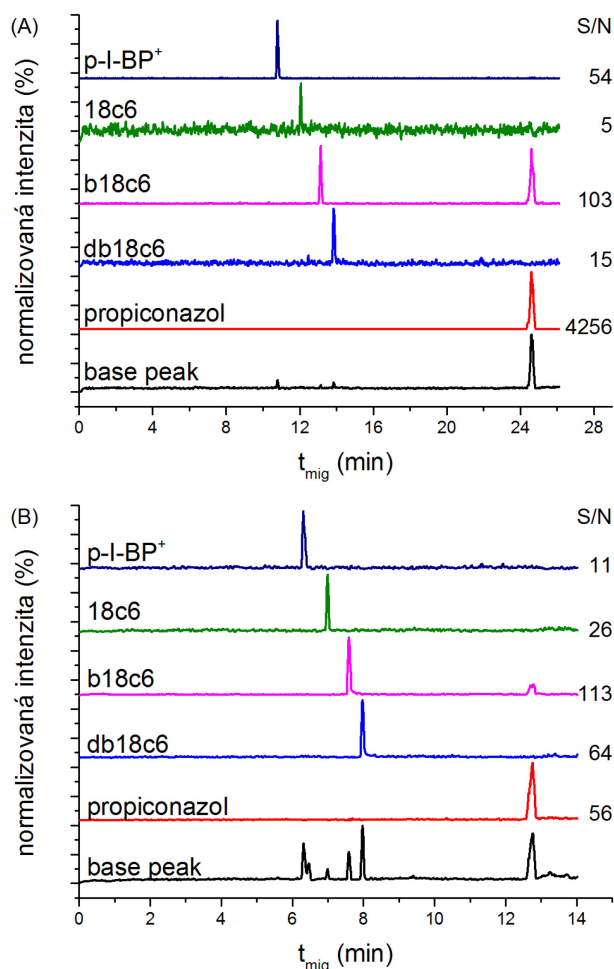
V původních Moiniho a Dovichiho publikacích zabývajících se vývojem výše uvedených rozhraní (ref. [28] a [111]) autoři vyzdvihují vysokou citlivost těchto rozhraní.

Při prvním posuzování obou rozhraní se CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou jeví jako citlivější, a to zejména díky absenci pomocné kapaliny, která ředí zóny analytů migrujících ze separační kapiláry. Porovnáním ACE-ESI/MS elektroforegramů změřených při použití rozhraní s porézní špičkou a rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny (Obr. 31) je však zřejmé, že citlivost rozhraní nezáleží jen na designu rozhraní, ale též na druhu analytů.



Z Obr. 31 vyplývá, že ředění zón analytů těkavou pomocnou kapalinou je ve prospěch citlivosti rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny v případě crown-etherů – tedy látek tvořících komplexy s netěkavými  $K^+$  ionty v BGE.

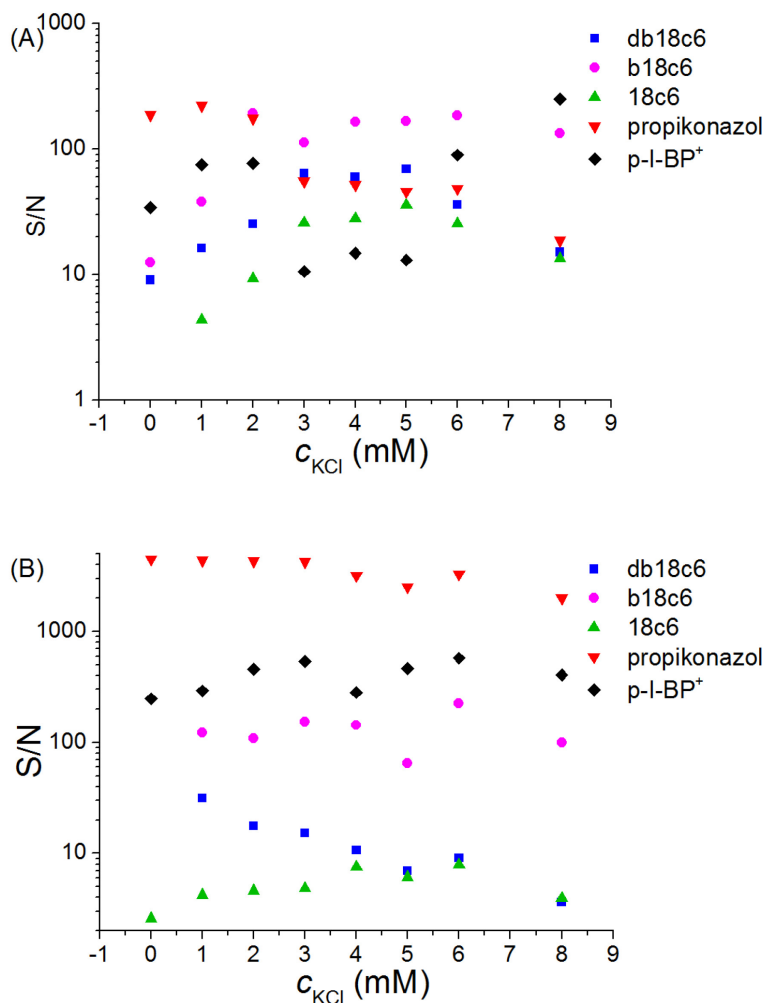
Porovnáním „base peak“ elektroforegramů získaných pomocí obou CE-ESI/MS rozhraní je zřejmé, že v případě rozhraní s porézní špičkou jsou signály komplexů crown etherů s  $K^+$  výrazně potlačeny a jejich intenzita je jen o málo vyšší než je intenzita ostatních iontů z BGE.



Obr. 31 Extrahované elektroforegramy crown etherů a markerů v BGE obsahujícím 3 mM KCl získané s využitím (A) rozhraní s porézní špičkou a (B) rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny.

Porovnáním S/N poměrů všech analytů (EOF a mobilitní markery, komplexy crown-etherů) získaných z ACE-ESI/MS měření s využitím obou rozhraní je patrné, že citlivost rozhraní s porézní špičkou je vyšší pro látky, které netvoří komplexy s ionty

přítomnými v BGE, tj. propikonazol (EOF marker) a p-l-benzylpyridiniový kation (mobilitní marker).



Obr. 32 Srovnání  $S/N$  poměrů analytů získaných pomocí (A) rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny a (B) rozhraní s porézní špičkou.

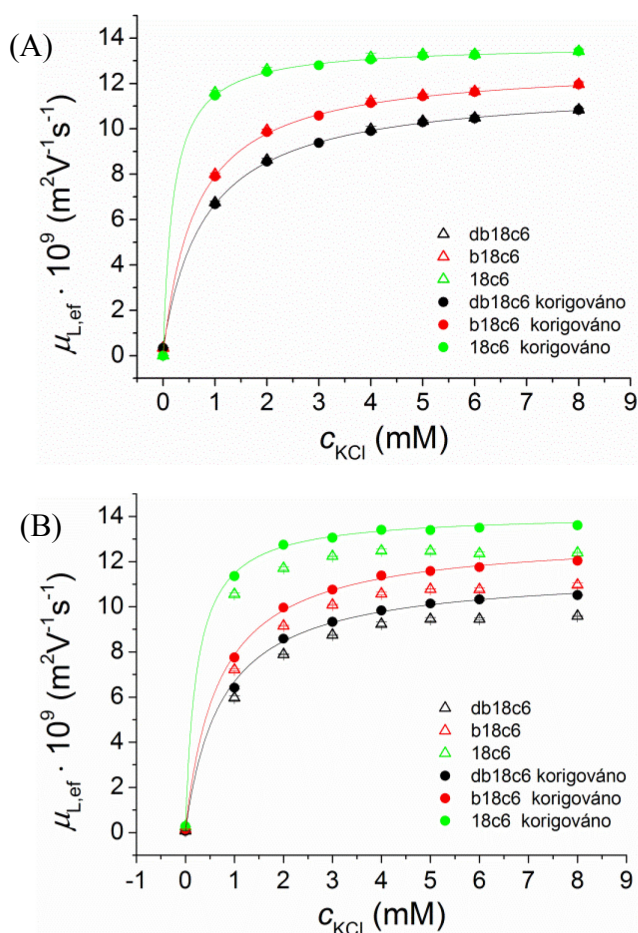
Interpretace trendů v závislostech  $S/N = f(c_{KCl})$  je komplikovaná, jelikož přidavkem KCl do BGE se mění vodivost BGE, rychlost EOF, rovnováhy mezi crown-ethery a K<sup>+</sup> ionty v primárních kapičkách vznikajících v elektrospreji, apod. Pokusy o souhrnné vysvětlení by za daných podmínek byly jen spekulace. Pro vyvozování závěrů by bylo zapotřebí experimenty provést na zařízení s citlivějším MS analyzátozem s větší vzorkovací frekvencí.

### ***Vhodnost CE-ESI/MS rozhraní pro stanovení konstant stability komplexů***

Vhodnost použití rozhraní s porézní špičkou a rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny pro stanovení konstant stability komplexů byla testována srovnáním hodnot  $K_{KL}$  stanovených metodou ACE-UV s hodnotami stanovenými metodou ACE-ESI/MS.

#### *Rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny*

Bylo zjištěno, že nestabilita  $U_{\text{spray}}$ , a tudíž i nestabilita  $U_{\text{sep}}$  pozorována v případě rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny s ESI emitérem s pozvolným zúžením špičky (Obr. 29) je znát na závislostech efektivních elektroforetických pohyblivostí ligandů na koncentraci  $K^+$  iontů v BGE (Obr. 33 B). V případě emitéru s prudkým zúžením špičky jsou  $\mu_{L,\text{eff}}$  spočítané z rozdílů napětí vložených na HV 1 a HV 2 podle rovnice (2.7) prakticky shodné s  $\mu_{L,\text{eff}}$  vypočítanými s využitím mobilitního markeru podle rovnice (4.5) – tj. korigovanými na mobilitní marker (Obr. 33 A). Naproti tomu v případě emitéru s pozvolným zúžením špičky jsou již rozdíly mezi korigovanými a nekorigovanými  $\mu_{L,\text{eff}}$  výrazné (Obr. 33 B).



Obr. 33 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí crown etherů na koncentraci  $K^+$  v BGE získané metodou ACE-ESI/MS s rozhraním s nano-tokem pomocné kapaliny s využitím (A) emitéru s prudkým zúžením špičky a (B) emitéru s pozvolným zúžením špičky.

Prostřednictvím  $\mu_{L,eff}$  tvar ESI emitéru ovlivňuje také výsledné stanovené konstanty stability komplexů a jejich elektroforetické pohyblivosti. V Tab. 5 jsou uvedeny zdánlivé konstanty stability komplexů crown etherů s  $K^+$  iontem stanovené v 60 % (v/v) methanolu.

Tab. 5 Zdánlivé podmíněné konstanty stability komplexů crown etherů s  $K^+$  ( $\pm$  SD) a jejich elektroforetické pohyblivosti ( $\pm$  SD) stanovené metodou ACE – MS ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O (3/2) při 20 °C.

ligand	porézní špička		nano tok SL, ESI emitér s pozvolným zúžením		nano tok SL, ESI emitér s prudkým zúžením	
	$K_{KL}$ (L mol <sup>-1</sup> )	$\mu_{KL} \cdot 10^9$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{KL}$ (L mol <sup>-1</sup> )	$\mu_{KL} \cdot 10^9$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{KL}$ (L mol <sup>-1</sup> )	$\mu_{KL} \cdot 10^9$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
18c6	6587 ± 1687	12.9 ± 1.0	5689 ± 1082	12.7 ± 1.0	5411 ± 151	13.8 ± 0.2
	4752 ± 163*	13.7 ± 0.4*	4232 ± 311*	14.1 ± 1.0*	5157 ± 109*	13.7 ± 0.2*
b18c6	1694 ± 134	12.2 ± 1.5	1455 ± 64	12.2 ± 0.8	1578 ± 28	12.9 ± 0.4
	1534 ± 33*	12.9 ± 0.3*	1466 ± 51*	13.1 ± 0.8*	1602 ± 8*	12.8 ± 0.1*
db18c6	1367 ± 117	11.3 ± 3.0	1565 ± 123	10.4 ± 1.0	1249 ± 15	11.9 ± 0.3
	1220 ± 29*	11.9 ± 0.4*	1357 ± 82*	11.5 ± 0.6*	1217 ± 11*	11.9 ± 0.2*

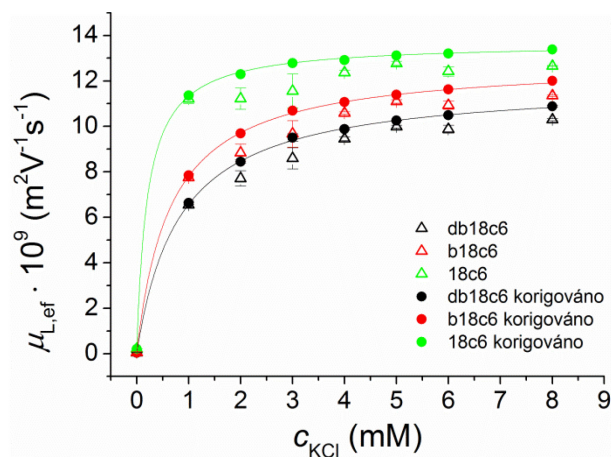
\* hodnoty získané po korekci na mobilitní marker

Porovnáním hodnot stanovených pomocí rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny a ESI emitérem s prudkým nebo pozvolným zúžením špičky (Tab. 5) je zřejmé, že opakovatelnost (vyjádřená jako SD) měření s ESI emitérem s pozvolným zúžením špičky je mnohem nižší než v případě druhého typu emitéru. Stejně jako opakovatelnost, i správnost výsledků získaných pomocí ESI emitéru s pozvolným zúžením špičky je nevyhovující. Korekcí hodnot na mobilitní marker lze částečně zredukovat SD i rozdíl mezi správnou  $K_{KL}$  (stanovenou pomocí ACE-UV) a stanovenou pomocí ACE-ESI/MS, nicméně ani tehdy data nedosahují takové kvality, jako data získaná měřeními s ESI emitérem s prudkým zúžením špičky (viz Tab. 3 a Tab. 5).

#### Rozhraní s porézní špičkou

Stejně jako u rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny, kdy byl použit ESI emitér s pozvolným zúžením špičky, i v tomto případě má nedostatečné oddělení  $U_{\text{spray}}$  od HV

1 vliv na  $\mu_{L,ef}$ . Rozdíly mezi  $\mu_{L,ef}$  spočtenými z teoretického  $U_{sep}$  podle rovnice (2.7) a  $\mu_{L,ef}$  spočtenými s využitím mobilitního markeru podle rovnice (4.5) jsou vidět na Obr. 34, kde jsou vyneseny závislosti  $\mu_{L,ef}$  na koncentraci KCl v BGE.



Obr. 34 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí crown etherů na koncentraci  $K^+$  v BGE získané metodou ACE-ESI/MS s rozhraním s porézní špičkou.

Vliv neefektivního oddělení  $U_{spray}$  od HV 1 na  $K_{KL}$  je zřejmý z Tab. 5.  $K_{KL}$  získané nelineární regresní analýzou závislosti  $\mu_{L,ef} = f(c_{KCl})$ , kdy byly použity  $\mu_{L,ef}$  bez korekce na mobilitní marker jsou méně správné a mají výrazně větší SD než ty, pro jejichž výpočet byly použity korigované  $\mu_{L,ef}$  (Tab. 5).

## 5 Závěr

Pro studium fyzikálně chemických charakteristik látek a komplexů byly využity kapilární elektromigrační metody s UV fotometrickou a hmotnostně spektrometrickou detekcí. Byly vyvinuty metody přípravy CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou a nano-tokem pomocné kapaliny a byly optimalizovány podmínky pro měření s těmito rozhraními.

Metodou kapilární zónové elektroforézy s UV fotometrickou detekcí byly stanoveny hodnoty aciditních disociačních konstant triazolových fungicidů (cyprokonazol, epoxikonazol, flusilazol, penkonazol, propikonazol a tebukonazol). Bylo zjištěno, že se jedná o slabé báze s  $pK_a < 2$ . Na základě tohoto zjištění byla testována afinita triazolových fungicidů k iontům alkalických kovů a jejich vhodnost pro použití jako markery elektroosmotického toku v ACE-ESI/MS. Z testovaných látek byl vybrán fungicid propikonazol, jehož interakce s alkalickými kovy nebyla pozorována a který poskytuje intenzivní MS signál.

Pro stanovení konstant stability komplexů crown-etherů (dibenzo-18-crown-6, benzo-18-crown-6 a 18-crown-6) s  $K^+$  iontem byly použity metody ACE-UV a ACE-ESI/MS. Data získaná pomocí ACE-UV byla použita jako referenční pro zhodnocení vhodnosti použití CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou a s nano-tokem pomocné kapaliny pro stanovení konstant stability. ACE-ESI/MS experimenty s využitím markerů elektroforetické a elektroosmotické pohyblivosti prokázaly, že pro stanovení konstant stability komplexů pomocí ACE-ESI/MS je vhodnější rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny, než rozhraní s porézní špičkou. Je to zejména proto, že u rozhraní s porézní špičkou není efektivně odděleno sprejovací napětí od napětí separačního a při změně složení BGE dochází k výrazné změně sprejovacího napětí. Také přesnost a správnost konstant stability stanovených pomocí CE-ESI/MS rozhraní s porézní špičkou je horší než v případě rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny. Další výhodou rozhraní s nano-tokem pomocné kapaliny pro stanovení konstant stability draselných komplexů crown etherů je vyšší citlivost tohoto rozhraní oproti rozhraní s porézní špičkou.

Výhoda ESI/MS detekce pro CE experimenty je schopnost citlivě detekovat i analyty, které nemohou být kvůli absenci chromoforů v jejich struktuře detekovány běžnými UV/vis detektory.

## 6 Literatura

1. Kalchenko, O.I., et al., *A comparative study of the determination of the stability constants of inclusion complexes of p-sulfonatocalix[4]arene with amino acids by RP-HPLC and <sup>1</sup>H NMR*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001(3): p. 258-263.
2. Winzor, D.J., *Determination of binding constants by affinity chromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1037**(1–2): p. 351-367.
3. Winzor, D.J., *Determination of binding constants by analogous procedures in size exclusion chromatography and capillary electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 2008. **383**(1): p. 1-17.
4. Jiang, C.X. and D.W. Armstrong, *Use of CE for the determination of binding constants*. Electrophoresis, 2010. **31**(1): p. 17-27.
5. Chen, Z. and S.G. Weber, *Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods*. TRAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(9): p. 738-748.
6. Dvorak, M., et al., *Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for determination of complexation constants*. Electrophoresis, 2013. **34**(5): p. 761-767.
7. Erk, M. and B. Raspor, *Anodic stripping voltammetry in the complexation study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56–61] MT I and cadmium: application in determination of the complexing capacity and stability constant*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2001. **502**(1–2): p. 174-179.
8. Tsybizova, A., et al., *Electrospray ionization mass spectrometric investigations of the complexation behavior of macrocyclic thiacycrown ethers with bivalent transitional metals (Cu, Co, Ni and Zn)*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(19): p. 2287-2294.
9. Segoviano-Garfias, J.J.N., G. Mendoza-Díaz, and R. Moreno-Esparza, *Spectrophotometric determination of the formation constants of the cupric halogen complexes with 1,3-propanediamine and 1,4-butanediamine in methanol solution and their activity on the oxidative coupling of the 2,6-di-tert-butylphenol*. Inorganica Chimica Acta, 2013. **400**(0): p. 184-190.
10. Rundlett, K.L. and D.W. Armstrong, *Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2194-2202.



11. Rundlett, K.L. and D.W. Armstrong, *Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(7): p. 1419-1427.
12. Ehala, S., et al., *ACE applied to the quantitative characterization of benzo-18-crown-6-ether binding with alkali metal ions in a methanol-water solvent system*. Electrophoresis, 2010. **31**(4): p. 702-708.
13. Šolínová, V., et al., *Estimation of apparent binding constant of complexes of selected acyclic nucleoside phosphonates with  $\beta$ -cyclodextrin by affinity capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2016. **37**(2): p. 239-247.
14. Salvador, A., et al., *Binding constant dependency of amphetamines with various commercial methylated beta-cyclodextrins*. Electrophoresis, 1999. **20**(13): p. 2670-2679.
15. Dubsky, P., et al., *Determination of the correct migration time and other parameters of the Haerhoff-van der Linde function from the peak geometry characteristics*. Electrophoresis, 2015. **36**(5): p. 655-661.
16. Dubsky, P., et al., *CEval: All-in-one software for data processing and statistical evaluations in affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2016. **1445**: p. 158-165.
17. Krenkova, J. and F. Foret, *On-line CE/ESI/MS interfacing: Recent developments and applications in proteomics*. Proteomics, 2012. **12**(19-20): p. 2978-2990.
18. Heemskerk, A.A.M., A.M. Deelder, and O.A. Mayboroda, *CE-ESI-MS for bottom-up proteomics: Advances in separation, interfacing and applications*. Mass Spectrometry Reviews, 2016. **35**(2): p. 259-271.
19. Hirayama, A. and T. Soga, *CE-MS in Metabolomics*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 293-314.
20. Yamamoto, M., et al., *Robust and High-Throughput Method for Anionic Metabolite Profiling: Preventing Polyimide Aminolysis and Capillary Breakages under Alkaline Conditions in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(21): p. 10710-10719.
21. Porpiglia, N., et al., *CE-MS in Forensic Sciences with Focus on Forensic Toxicology*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 217-291.
22. Schappler, J., V. González-Ruiz, and S. Rudaz, *CE-MS in Drug Analysis and Bioanalysis*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 129-157.

23. Acunha, T., et al., *CE-MS in Food Analysis and Foodomics*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 193-215.
24. Topin, S., J. Aupiais, and N. Baglan, *Determination of the stability constants of nitrate complexes of Np(V) and Pu(V) using CE-ICP-MS*. *Radiochimica Acta*, 2010. **98**(2): p. 71-75.
25. Sun, J., et al., *Characterization of interactions between organotin compounds and human serum albumin by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Talanta*, 2012. **93**: p. 239-244.
26. Mironov, G.G., et al., *Comparative Study of Three Methods for Affinity Measurements: Capillary Electrophoresis Coupled with UV Detection and Mass Spectrometry, and Direct Infusion Mass Spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2012. **23**(7): p. 1232-1240.
27. Mokaddem, M., et al., *New insight into suction and dilution effects in CE coupled to MS via an ESI interface. II - Dilution effect*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(10): p. 1692-1697.
28. Moini, M., *Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(11): p. 4241-4246.
29. Sun, L.L., et al., *Third-Generation Electrokinetically Pumped Sheath-Flow Nanospray Interface with Improved Stability and Sensitivity for Automated Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry Analysis of Complex Proteome Digests*. *Journal of Proteome Research*, 2015. **14**(5): p. 2312-2321.
30. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. *Transactions of the Faraday Society*, 1937. **33**(0): p. 524-531.
31. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. *Analytical Chemistry*, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
32. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Capillary zone electrophoresis*. *Science*, 1983. **222**(4621): p. 266-272.
33. El Deeb, S., et al., *Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis (2013–2015)*. *ELECTROPHORESIS*, 2016. **37**(12): p. 1591-1608.
34. Tagliaro, F., J.P. Pascali, and S.W. Lewis, *Capillary Electrophoresis in Forensic Chemistry A2 - Siegel, Jay A*, in *Encyclopedia of Forensic Sciences*, P.J. Saukko and M.M. Houck, Editors. 2013, Academic Press: Waltham. p. 567-572.
35. Jenkins, M.A. and S. Ratnaike, *Capillary Electrophoresis in Clinical Analysis*, in *Medical Biomethods Handbook*, J.M. Walker and R. Rapley, Editors. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 519-530.

36. Rodriguez Robledo, V. and W.F. Smyth, *The application of CE-MS in the trace analysis of environmental pollutants and food contaminants*. Electrophoresis, 2009. **30**(10): p. 1647-60.
37. Stepanova, S. and V. Kasicka, *Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomic and peptidomic analyses*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(1): p. 198-211.
38. Stepanova, S. and V. Kasicka, *Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins*. Analytica Chimica Acta, 2016. **933**: p. 23-42.
39. Kasicka, V., *Recent developments in capillary and microchip electrosparations of peptides (2013-middle 2015)*. Electrophoresis, 2016. **37**(1): p. 162-188.
40. Stepanova, S. and V. Kasicka, *Determination of impurities and counterions of pharmaceuticals by capillary electromigration methods*. Journal of Separation Science, 2014. **37**(15): p. 2039-2055.
41. Solinova, V. and V. Kasicka, *Determination of acidity constants and ionic mobilities of polyprotic peptide hormones by CZE*. Electrophoresis, 2013. **34**(18): p. 2655-2665.
42. Nowak, P., M. Wozniakiewicz, and P. Koscielniak, *Application of capillary electrophoresis in determination of acid dissociation constant values*. Journal of Chromatography A, 2015. **1377**: p. 1-12.
43. Porras, S.P., et al., *Mobility and ionization constant of basic drugs in methanol. Application of nonaqueous background electrolytes for capillary zone electrophoresis based on a conventional pH scale*. Journal of Microcolumn Separations, 2001. **13**(4): p. 149-155.
44. Falkenhagen, H., M. Leist, and G. Kelbg, *Zur Theorie der Leitfähigkeit starker nicht assoziierender Elektrolyte bei höheren Konzentrationen*. Annalen Der Physik, 1952. **11**(1): p. 51-59.
45. Pitts, E., *An extension of the theory of the conductivity and viscosity of electrolyte solutions*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 1953. **217**(1128): p. 43-70.
46. Gomez, J.E. and E. Sandoval, *The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance*. Electrophoresis, 2008. **29**(2): p. 381-392.
47. Wan, Q.H., *Capillary electrochromatography: effect of electrolyte concentration on electroosmotic flow and column efficiency*. Journal of Chromatography A, 1997. **782**(2): p. 181-189.

48. Robb, C.S., *Applications of physically adsorbed polymer coatings in capillary electrophoresis*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2007. **30**(5-8): p. 729-759.
49. Lucy, C.A., A.M. MacDonald, and M.D. Gulcev, *Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 81-105.
50. Huhn, C., et al., *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **396**(1): p. 297-314.
51. Kasicka, V., et al., *Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field*. Electrophoresis, 1999. **20**(12): p. 2484-2492.
52. Coufal, P., et al., *The magnitude and reproducibility of the electroosmotic flow in silica capillary tubes*. Hrc-Journal of High Resolution Chromatography, 1994. **17**(5): p. 325-334.
53. Yang, J., S. Rose, and D.S. Hage, *Improved reproducibility in capillary electrophoresis through the use of mobility and migration time ratios*. Journal of Chromatography A, 1996. **735**(1-2): p. 209-220.
54. Chamieh, J., M. Martin, and H. Cottet, *Quantitative Analysis in Capillary Electrophoresis: Transformation of Raw Electropherograms into Continuous Distributions*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(2): p. 1050-1057.
55. Wang, W., et al., *Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2007. **1170**(1-2): p. 1-8.
56. Williams, B.A. and G. Vigh, *Determination of accurate electroosmotic mobility and analyte effective mobility values in the presence of charged interacting agents in capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(21): p. 4445-4451.
57. Ehala, S., et al., *Determination of acid-base dissociation constants of very weak zwitterionic heterocyclic bases by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography a, 2010. **1217**(51): p. 8048-8053.
58. Mrestani, Y., et al., *Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1998. **803**(1-2): p. 273-278.
59. Chen, M. and R.M. Cassidy, *Bonded-phase capillaries and the separation of inorganic-ions by high-voltage capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1992. **602**(1-2): p. 227-234.

60. Karakasyan, C., M. Taverna, and M.C. Millot, *Determination of binding constants of hydrophobically end-capped poly(ethylene glycol)s with beta-cyclodextrin by affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2004. **1032**(1-2): p. 159-164.
61. Hellqvist, A., Y. Hedeland, and C. Pettersson, *Evaluation of electroosmotic markers in aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2013. **34**(24): p. 3252-3259.
62. Szumski, M. and B. Buszewski, *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis, in Electromigration Techniques: Theory and Practice*, B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, and M. Szumski, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 203-213.
63. Tjornelund, J. and S.H. Hansen, *Non-aqueous capillary electrophoresis of drugs: properties and application of selected solvents*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1999. **38**(2): p. 139-153.
64. Porras, S.P. and E. Kenndler, *Are the asserted advantages of organic solvents in capillary electrophoresis real? A critical discussion*. Electrophoresis, 2005. **26**(17): p. 3203-3220.
65. Schwer, C. and E. Kenndler, *Electrophoresis in fused silica capillaries - The influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta-potential*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(17): p. 1801-1807.
66. Dizechi, M. and E. Marschall, *Viscosity of some binary and ternary liquid-mixtures*. Journal of Chemical and Engineering Data, 1982. **27**(3): p. 358-363.
67. Khattab, I.S., et al., *Density, viscosity, and surface tension of water plus ethanol mixtures from 293 to 323 K*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012. **29**(6): p. 812-817.
68. Sollman, K. and E. Marschall, *Viscosity of selected binary, ternary and quaternary liquid-mixtures*. Journal of Chemical and Engineering Data, 1990. **35**(4): p. 375-381.
69. Aminabhavi, T.M. and B. Gopalakrishna, *Density, viscosity, refractive index, and speed of sound in aqueous mixtures of N,N-dimethylformamide, dimethylsulfoxide, N,N-dimethylacetamide, acetonitrile, ethylene-glycol, diethylene glycol, 1,4-dioxane, tetrahydrofuran, 2-methoxyethanol, and 2-ethoxyethanol at 298.15 K*. Journal of Chemical and Engineering Data, 1995. **40**(4): p. 856-861.
70. Gagliardi, L.G., et al., *Static dielectric constants of acetonitrile/water mixtures at different temperatures and Debye-Huckel A and a(0)B parameters for activity coefficients*. Journal of Chemical and Engineering Data, 2007. **52**(3): p. 1103-1107.

71. Akerlof, G., *Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures*. Journal of the American Chemical Society, 1932. **54**(11): p. 4125-4472.
72. Wyman, J., *The dielectric constant of mixtures of ethyl alcohol and water from -5 to 40°*. Journal of the American Chemical Society, 1931. **53**(9): p. 3292-3301.
73. Albright, P.S. and L.J. Gosting, *Dielectric constants of the methanol water system from 5-degrees to 55-degrees*. Journal of the American Chemical Society, 1946. **68**(6): p. 1061-1063.
74. Patel, D.C., et al., *Gone in Seconds: Praxis, Performance, and Peculiarities of Ultrafast Chiral Liquid Chromatography with Superficially Porous Particles*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(18): p. 9137-9148.
75. Swinney, K. and D.J. Bornhop, *Detection in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(7): p. 1239-1250.
76. Kleparnik, K., *Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: Methodology and theory*. Electrophoresis, 2015. **36**(1): p. 159-178.
77. Tycova, A., V. Ledvina, and K. Kleparnik, *Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications*. Electrophoresis, 2017. **38**(1): p. 115-134.
78. Norkova, R., J.J. Dyrtrtova, and V. Kasicka, *Ionization Techniques and Interfaces for Coupling of Capillary Electromigration Methods with Mass Spectrometry Detection*. Chemicke Listy, 2013. **107**(12): p. 949-955.
79. Beck, W. and H. Engelhardt, *Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection*. Chromatographia, 1992. **33**(7): p. 313-316.
80. Couderc, F., V. Ong-Meang, and V. Poinot, *Capillary electrophoresis hyphenated with UV-native-laser induced fluorescence detection (CE/UV-native-LIF)*. Electrophoresis, 2017. **38**(1): p. 135-149.
81. Lacroix, M., et al., *Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2005. **26**(13): p. 2608-2621.
82. Kulp, M., et al., *Capillary electrophoresis with led-induced native fluorescence detection for determination of isoquinoline alkaloids and their cytotoxicity in extracts of Chelidonium majus L.* Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(31): p. 5298-5304.
83. Kuhr, W.G. and E.S. Yeung, *Indirect fluorescence detection of native amino-acids in capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(17): p. 1832-1834.

84. Holland, L.A. and A.M. Leigh, *Amperometric and voltammetric detection for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2002. **23**(21): p. 3649-3658.
85. Cvacka, J., et al., *Boron-doped diamond microelectrodes for use in capillary electrophoresis with electrochemical detection*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(11): p. 2678-2687.
86. Tuma, P., et al., *The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for monitoring of glycerol in adipose tissues during a sporting performance*. Electrophoresis, 2010. **31**(12): p. 2037-2043.
87. Kuban, P. and P.C. Hauser, *Contactless conductivity detection for analytical techniques-Developments from 2012 to 2014*. Electrophoresis, 2015. **36**(1): p. 195-211.
88. Kuban, P. and P.C. Hauser, *Contactless conductivity detection for analytical techniques Developments from 2014 to 2016*. Electrophoresis, 2017. **38**(1): p. 95-114.
89. Mark, J.J.P., R. Scholz, and F.M. Matysik, *Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2012. **1267**: p. 45-64.
90. Huck, C.W., et al., *Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry*. Electrophoresis, 2006. **27**(11): p. 2063-2074.
91. Pantuckova, P., et al., *Electrolyte systems for on-line CE-MS: detection requirements and separation possibilities*. Electrophoresis, 2009. **30**(1): p. 203-14.
92. Olivares, J.A., et al., *Online mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
93. Haselberg, R. and G.W. Somsen, *CE-MS for the analysis of intact proteins*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 159-192.
94. Ramautar, R. and P. Britz-McKibbin, *CE-MS for Clinical Proteomics and Metabolomics: Strategies and Applications*, in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 315-343.
95. Schmidt, A., M. Karas, and T. Dülcks, *Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(5): p. 492-500.

96. Tang, L. and P. Kebarle, *Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(24): p. 3654-3668.
97. Juraschek, R., T. Dülcks, and M. Karas, *Nanoelectrospray—More than just a minimized-flow electrospray ionization source*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(4): p. 300-308.
98. Shelton, C.M., et al., *Enhanced selectivity for capillary zone electrophoresis using ion-pair agents*. Journal of Chromatography A, 1997. **792**(1-2): p. 455-462.
99. Rundlett, K.L. and D.W. Armstrong, *Mechanism of Signal Suppression by Anionic Surfactants in Capillary Electrophoresis—Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(19): p. 3493-3497.
100. Hommerson, P., et al., *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application*. Mass Spectrometry Reviews, 2011. **30**(6): p. 1096-1120.
101. Isoo, K., K. Otsuka, and S. Terabe, *Application of sweeping to micellar electrokinetic chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of environmental pollutants*. ELECTROPHORESIS, 2001. **22**(16): p. 3426-3432.
102. Hommerson, P., et al., *Capillary Electrophoresis-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Using an Orthogonal Interface: Set-Up and System Parameters*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(7): p. 1311-1318.
103. Hommerson, P., et al., *Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization for coupling of micellar electrokinetic chromatography with ion trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1204**(2): p. 197-203.
104. Hommerson, P., et al., *Drug impurity profiling by capillary electrophoresis/mass spectrometry using various ionization techniques*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(18): p. 2878-2884.
105. Chang, C.L., et al., *Online Coupling of Capillary Electrophoresis with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(1): p. 170-176.
106. Barbula, G.K., et al., *Interfacing Capillary-Based Separations to Mass Spectrometry Using Desorption Electrospray Ionization*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(6): p. 1955-1959.
107. Pourhaghighi, M.R., J.M. Busnel, and H.H. Girault, *High-sensitive protein analysis by FESI-CE-MALDI-MS*. Electrophoresis, 2011. **32**(14): p. 1795-1803.



108. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**(1): p. 37-70.
109. Delamora, J.F. and I.G. Loscertales, *The current emitted by highly conducting Taylor cones*. Journal of Fluid Mechanics, 1994. **260**: p. 155-184.
110. Causon, T.J., et al., *Addition of reagents to the sheath liquid: A novel concept in capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2014. **1343**: p. 182-187.
111. Wojcik, R., et al., *Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(17): p. 2554-2560.
112. Sun, L.L., et al., *Capillary zone electrophoresis for bottom-up analysis of complex proteomes*. Proteomics, 2016. **16**(2): p. 188-196.
113. Zhong, X.F., E.J. Maxwell, and D.D.Y. Chen, *Mass Transport in a Micro Flow-Through Vial of a Junction-at-the-Tip Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Interface*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(12): p. 4916-4923.
114. Maxwell, E.J., et al., *Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS*. Electrophoresis, 2010. **31**(7): p. 1130-1137.
115. Gonzalez-Ruiz, V., et al., *Evaluation of a new low sheath-flow interface for CE-MS*. Electrophoresis, 2016. **37**(7-8): p. 936-46.
116. Vuignier, K., et al., *Improvement of a capillary electrophoresis/frontal analysis (CE/FA) method for determining binding constants: Discussion on relevant parameters*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **53**(5): p. 1288-1297.
117. Gao, J.Y., P.L. Dubin, and B.B. Muhoberac, *Measurement of the Binding of Proteins to Polyelectrolytes by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(15): p. 2945-2951.
118. Østergaard, J. and N.H.H. Heegaard, *Bioanalytical interaction studies executed by preincubation affinity capillary electrophoresis*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(13): p. 2590-2608.
119. Busch, M.H.A., J.C. Kraak, and H. Poppe, *Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **777**(2): p. 329-353.
120. Ehala, S., V. Kasicka, and E. Makrlik, *Determination of stability constants of valinomycin complexes with ammonium and alkali metal ions by capillary affinity electrophoresis*. Electrophoresis, 2008. **29**(3): p. 652-657.

121. Busch, M.H.A., et al., *Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants*. Journal of Chromatography A, 1997. **775**(1–2): p. 313-326.
122. Zins, E.-L., C. Pepe, and D. Schröder, *Energy-dependent dissociation of benzyropyridinium ions in an ion-trap mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 2010. **45**(11): p. 1253-1260.
123. Tycova, A., J. Prikryl, and F. Foret, *Reproducible preparation of nanospray tips for capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry using 3D printed grinding device*. Electrophoresis, 2016. **37**(7-8): p. 924-930.
124. Tycova, A., et al., *Interface-free capillary electrophoresis-mass spectrometry system with nanospray ionization Analysis of dexrazoxane in blood plasma*. Journal of Chromatography A, 2016. **1466**: p. 173-179.
125. Sun, L.L., et al., *Capillary zone electrophoresis for analysis of complex proteomes using an electrokinetically pumped sheath flow nanospray interface*. Proteomics, 2014. **14**(4-5): p. 622-628.
126. Mokaddem, M., et al., *A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect*. Electrophoresis, 2008. **29**(10): p. 1957-1964.
127. Li, S.W., et al., *1H-1,2,4-triazole: An effective solvent for proton-conducting electrolytes*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(24): p. 5884-5886.
128. Cadkova, E., et al., *pK(a) constant determination of two triazole pesticides: Tebuconazole and Penconazole*. Journal of Solution Chemistry, 2013. **42**(5): p. 1075-1082.
129. Tulp, H.C., et al., *Experimental determination of LSER parameters for a set of 76 diverse pesticides and pharmaceuticals*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(6): p. 2034-2040.
130. ARChem, L. *SPARC Performs Automated Reasoning in Chemistry*. 2011; Available from: <http://www.archemcalc.com/sparc.html>.
131. Arias, M., et al., *Influence of pH and soil copper on adsorption of metalaxyl and penconazole by the surface layer of vineyard soils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(21): p. 8155-8162.
132. Chimuka, L., et al., *Influence of temperature on mass transfer in an incomplete trapping supported liquid membrane extraction of triazole fungicides*. Journal of Separation Science, 2009. **32**(7): p. 1043-1050.
133. Wu, Q.L., et al., *Combined effects of the fungicide propiconazole and agricultural runoff sediments on the aquatic bryophyte Vesicularia dubyana*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005. **24**(9): p. 2285-2290.

134. Hilal, S.H., S.W. Karickhoff, and L.A. Carreira, *A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: Estimation of more than 4300 ionization pK(a)s*. Quantitative Structure-Activity Relationships, 1995. **14**(4): p. 348-355.
135. Jakl, M., et al., *Investigation of Complexes of Tebuconazole with Zinc*. Modern Electrochemical Methods Xxxii. 2012. 50-53.
136. Norkova, R., et al., *Formation of Tebuconazole Complexes with Cadmium(II) Investigated by Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Water Air and Soil Pollution, 2012. **223**(5): p. 2633-2640.
137. Dytrtova, J.J., et al., *In situ generation of copper cations and complexation with tebuconazole in a hyphenation of electrochemistry with mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2013. **338**: p. 45-49.
138. Dytrtova, J.J., et al., *Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications*. International Journal of Mass Spectrometry, 2014. **359**: p. 38-43.
139. Norková, R., *Studium komplexů tebukonazolu s ionty kovů*, in *Přírodovědecká Fakulta*. 2012, Karlova Univerzita: Praha.
140. Keller, B.O., et al., *Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2008. **627**(1): p. 71-81.

## 7 Přílohy

Seznam příloh

Publikace I: Ionization Techniques and Interfaces for Coupling of Capillary Electromigration Methods with Mass Spectrometry Detection

Publikace II: Theoretical insight into the stabilization of triazole fungicides via their interactions with dications

Publikace III: Determination of acid dissociation constants of triazole fungicides by pressure assisted capillary electrophoresis

Publikace IV: Study of solvent effects on stability constant and ionic mobility of dibenzo-18-crown-6 complex with potassium ion by affinity capillary electrophoresis

Publikace V: Comparative study of two CE-MS interfaces for determination of stability constants of potassium-crown ether complexes by ACE-ESI/MS

Životopis